

## P. INT COOPERATION TREA

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 14 May 1999 (14.05.99)	
International application No.: PCT EP98 06952	Applicant's or agent's file reference: 48170AWO-Kn
International filing date: 03 November 1998 (03.11.98)	Priority date: 04 November 1997 (04.11.97)
Applicant: KESSLER, Christoph et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

09 March 1999 (09.03.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer:

J. Zahra

Facsimile: 41 22 719 11 95

Telex: 41 22 500 000



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 03 MAR 2000

WIPO PCT

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4817/OA/VO-Kn	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06952	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/11/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  09/03/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  01.03.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Linker, W  Tel Nr +49 89 2399 8703







**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-59                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-25                      eingegangen am                      24/12/1999    mit Schreiben vom    22/12/1999

**Zeichnungen, Blätter:**

1/8-8/8                      ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,                      Seiten:  
☐ Ansprüche,                      Nr.:  
☐ Zeichnungen,                      Blatt:

3. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

**siehe Beiblatt**

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.  
☒ Ansprüche Nr. 24, 25.

Begründung:



- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 24, 25 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

**IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
  - ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
  - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
  - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
  - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
  - ☐ erfüllt ist
  - ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
  - ☒ alle Teile.
  - ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.



**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	5, 8, 9, 21
	Nein: Ansprüche	1-4, 6, 7, 10-20, 22
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-22
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-22
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**



**Zu Punkt I**

**Grundlage des Berichts**

Die mit Schreiben vom 22.12.99 eingereichten Änderungen bringen Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34 (2) b) PCT über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen. Es handelt sich dabei um folgende Änderungen:

Anspruch 1: oder weniger als 3 Nukleotide,

Anspruch 5: die Gesamtlänge der des Amplifikats 74 Nukleotide nicht überschreitet,

Anspruch 16: daß mindestens einer der Primer nicht für die Gruppe von Organismen spezifisch ist, der der nachzuweisende Organismus angehört, sowie die Gegenstände der Ansprüche 24 und 25.

Die unter Punkt IV, V und VIII gemachte Feststellung bezieht sich daher auf die ursprünglich vorgelegten Ansprüche 1-22.

**Zu Punkt IV**

**Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

Die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche 1, 15, 16, 20 und 22 sind durch kein gemeinsames technisches Merkmal verbunden, das einen Beitrag jeder beanspruchten Erfindung als Ganzes zum Stand der Technik bestimmt, es wird daher zwischen den vorgenannten Ansprüchen keine gemeinsame erfinderische Idee verwirklicht.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**





Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: WO 91 10675 A (STICHTING RES FONDS PATHOLOGIE) 25. Juli 1991 (1991-07-25)
- D2: US-A-5 538 848 (LIVAK KENNETH J ET AL) 23. Juli 1996 (1996-07-23)
- D3: EP-A-0 070 685 (STANDARD OIL CO) 26. Januar 1983 (1983-01-26)
- D4: US-A-5 527 898 (BAUER HEIDI M ET AL) 18. Juni 1996 (1996-06-18)
- D5: WO 96 29431 A (SEQUENOM INC) 26. September 1996 (1996-09-26)
- D6: EP-A-0 229 701 (CETUS CORP) 22. Juli 1987 (1987-07-22)
- D7: CHELLY J ET AL: 'Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glia cells.' NATURE, (1990 MAR 1) 344 (6261) 64-5. , XP002108801
- D8: EP-A-0 593 789 (SUMITOMO METAL IND) 27. April 1994 (1994-04-27)
- D9: WO 92 19743 A (CHIRON CORP) 12. November 1992 (1992-11-12)
- D10: WO 96 35437 A (IMMUNO AG ;EIBL JOHANN (AT); SCHWARZ OTTO (AT); DORNER FRIEDRICH () 14. November 1996 (1996-11-14)

Ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren mit den Merkmalen der Ansprüche 1-4, 10-12, 14, 16, 17 und 19 ist bereits aus D1 bekannt. D1 offenbart die Verwendung von Proben, die das ganze Amplikon umfassen, sowie universelle (unspezifische) Primer (siehe Seite 4, Zeile 8 - Seite 5, Zeile 17; Seite 8, Zeile 14 - Seite 9, Zeile 16; Seite 12, Zeile 13 - Seite 13, Zeile 7; Seite 14 - Seite 20, Zeile 28).

Ein Verfahren mit den Merkmalen der Ansprüche 1, 4, 6, 7, 10-14 und 16-19 ist aus D4 bekannt. D4 offenbart die Verwendung von Proben, welche den gesamten Bereich der Sequenz zwischen den Amplifikationsprimern umfassen, sowie unspezifische und immobilisierte Proben und Primer (siehe Spalte 8, Zeile 22 - Spalte 9, Zeile 5; Spalte 10, Zeile 26 - Spalte 11, Zeile 30; Spalte 17, Zeile 48 - Spalte 18, Zeile 61, Beispiele 1 und 3).

Weiterhin sind die Gegenstände der Ansprüche 15, 20 und 22 aus den Dokumenten D5, D7, D8 bzw. D9 bekannt.

D5 offenbart den Nachweis der Amplifikationsprodukte mittels Massenspektroskopie, siehe Seite 15, Zeile 18 - Seite 16, Zeile 4; Seite 41, Zeile 15 - Seite 44, Zeile 22; Abbildungen 5 und 21; Beispiel 5. D7 offenbart die gleichzeitige Amplifikation eines 67 und eines 81 bp Fragments, siehe Abbildung 1. D8 offenbart den Nachweis von HBV Mutationen durch Analyse der Restriktionsmuster von Amplifikationsprodukten, wildtyp



und mutante Fragmente (< 100 bp) werden gleichzeitig amplifiziert, siehe Seite 4, Zeile 50 - Seite 6, Zeile 40. D9 offenbart die Verwendung der Seq. ID Nr. 128 zum Nachweis von HCV, diese Sequenz hat >80 % Übereinstimmung mit der Seq. ID Nr. 9 der vorliegenden Anmeldung.

Die Gegenstände der Ansprüche 15, 20 und 22 erfüllen daher nicht die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT.

Die Ausführungsform gemäß Anspruch 5 scheint kein zusätzliches Merkmal zu enthalten, was als erfinderisch angesehen werden könnte, da kurze Amplifikationsprodukte üblich sind, wenn Viren oder Viroide amplifiziert werden, siehe D6, D7 oder D8.

Die Ansprüche 8 oder 9 betreffen übliche Ausgestaltungen eines Nachweisverfahrens für Nukleinsäuren (siehe D2 oder D3). Der Gegenstand dieser Ansprüche scheint daher nicht erfinderisch zu sein.

Bei dem Merkmal des Anspruchs 21, Amplifikate der Nukleinsäuren von HIV, HBV und HCV gleichzeitig herzustellen, handelt es sich um eine Möglichkeit, die der Fachmann ohne erfinderisches Zutun den Umständen in Betracht ziehen würde, um die gestellte Aufgabe zu lösen.

Die Gegenstände der Ansprüche 5, 8, 9 und 21 erfüllen daher nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT.

#### **Zu Punkt VII**

##### **Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1-D10 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

#### **Zu Punkt VIII**



**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Der Anspruch 22 enthält eine Bezugnahme auf die Beschreibung bzw. die Zeichnungen. Gemäß Regel 6.2 a) PCT dürfen Ansprüche nur dann Bezugnahmen enthalten, wenn dies unbedingt erforderlich ist, was hier nicht der Fall ist.



## Patentansprüche

### 1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte

- Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann.
- Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und
- Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde,

dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine oder weniger als 3 Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören und die Amplifikate kürzer als 100 Nukleotide sind.

- 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer oder beiden Bindesequenzen der Primer überlappt.
- 3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer an seinem nicht verlängerbaren Teil Nukleotide aufweist, die nicht direkt mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement hybridisieren.
- 4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
- 5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge der des Amplifikats 74 Nukleotide nicht überschreitet.





6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer immobilisierbar und die Sonde nachweisbar markiert ist.
7. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
5 mindestens einer der Primer nachweisbar und die Sonde immobilisierbar markiert oder immobilisiert ist.
8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.
- 10 9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Primer durch eine erste Energietransferkomponente und die Sonde durch eine zweite, davon verschiedene Energietransferkomponente markiert ist.
10. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
15 das Amplifikat durch physikalische und/oder spektroskopische Methoden detektiert wird.
11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
- 20 13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.
- 25 15. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Amplifikate mittels Massenspektroskopie erfolgt.



16. Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte

- Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer,
- Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und
- Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde.

dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die Gruppe von Organismen spezifisch ist, der der nachzuweisende Organismus angehört und die Amplifikate kürzer als 100 Nukleotide sind.

10 17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.

15 19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.

20 20. Verfahren zur gleichzeitigen Herstellung von Amplifikaten von Teilen von Nukleinsäuren, bei dem Primer eingesetzt werden, die eine Amplifikation dieser Teile mit den unterschiedlichen Sequenzen erlauben, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer so ausgewählt werden, daß die gebildeten Amplifikate in ihrer Länge um nicht mehr als 20 % unterscheiden und nicht länger als 100 Nukleotide sind.

21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig Amplifikate von Nukleinsäuren von HIV, HBV und HCV hergestellt werden.

25 22. Verfahren zum Nachweis von HCV, dadurch gekennzeichnet, daß zwei Primer und eine Sonde verwendet werden, deren Sequenzen aus Sequenzen von fortlaufenden Basen der unten dargestellten HGBV-Sequenz, hierzu komplementären Sequenzen oder Sequenzen mit mehr als 80% Identität zu diesen Sequenzen entnommen sind:



5'-GTACTGCCTG ATAGGGTCCT TCGAGGGGA TCTGGGAGTC  
TCGTAGACCG TAGCACATG-3'.

23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß HCV-RNA nachgewiesen wird.

5

24. Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuren umfassend die Schritte

- gleichzeitige Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten von Teilstücken dieser Nukleinsäuren mit Hilfe von Paaren zweier Primer, von denen je einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-  
10 Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann, wobei die Primer so ausgewählt sind, daß sich die gebildeten Amplifikate in ihrer Länge um nicht mehr als 20 % unterscheiden und nicht länger als 100 Nukleotide sind,

15

- Inkontaktbringen der jeweiligen Amplifikate mit je einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und

- Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und einer Sonde,

20

wobei die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine oder weniger als 3 Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören und die Amplifikate kürzer als 100 Nukleotide sind.

25. Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig Amplifikate von Nukleinsäuren von HIV, HBV und HCV hergestellt werden.



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 4817/0A/WO-Kn	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/06952	International filing date ( <i>day month year</i> ) 03 November 1998 (03.11.98)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 04 November 1997 (04.11.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.



This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 March 1999 (09.03.99)	Date of completion of this report 01 March 2000 (01.03.2000)
Name and mailing address of the IPEA EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06952

## 1. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-59, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 1-25, filed with the letter of 22 December 1999 (22.12.1999),  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/8-8/8, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See annex



**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

The amendments filed with the letter of 22.12.99 introduce matter which goes beyond the disclosure in the application as filed, in contravention of PCT Article 34(2)(b). The following amendments are concerned:

Claim 1: or fewer than three nucleotides.

Claim 5: the total length of the amplificate does not exceed 74 nucleotides,

Claim 16: at least one of the primers is not specific for the group of organisms to which the organism to be detected belongs, and  
the subject matter of Claims 24 and 25.

The statements made in Boxes IV, V and VIII therefore refer to Claims 1-22 as filed.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06952

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 24,25.

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ the claims, or said claims Nos. 24,25 are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/EP98/06952

## IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See annex

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_





**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of IV

The subject matter of independent Claims 1, 15, 16, 20 and 22 is not linked by a single common technical feature that defines a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art. Consequently, the above-indicated claims fail to realize a common inventive concept.



V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Claims	5, 8, 9, 21	YES
	Claims	1-4, 6, 7, 10-20, 22	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-22	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22	YES
	Claims		NO

2 Citations and explanations

The following documents are referred to:

D1: WO-A-91/10675 (STICHTING PES FONDS PATHOLOGIE) 25 July 1991 (1991-07-25)

D2: US-A-5 538 848 (LIVAK KENNETH J ET AL.) 23 July 1996 (1996-07-23)

D3: EP-A-0 070 685 (STANDARD OIL CO) 26 January 1983 (1983-01-26)

D4: US-A-5 527 898 (BAUER HEIDI M ET AL.) 18 June 1996 (1996-06-18)

D5: WO-A-96/29431 (SEQUENOM INC) 26 September 1996 (1996-09-26)

D6: EP-A-0 229 701 (CETUS CORP) 22 July 1987 (1987-07-22)

D7: CHELLY J ET AL.: "Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glia cells", NATURE, (1990 MAR 1) 344 5261 54-5., XP002108801

D8: EP-A-0 593 789 (SUMITOMO METAL IND) 27 April 1994 (1994-04-27)

D9: WO-A-92/19743 (CHIRON CORP) 12 November 1992 (1992-11-12)

D10: WO-A-96/35437 (IMMUNO AG; EIBL JOHANN (AT); SCHWARZ OTTO (AT); DORNER FRIEDRICH) 14 November 1996 (1996-11-14)

A process having the features of Claims 1-4, 10-12, 14,



16, 17 and 19 for detecting nucleic acids is known from D1. D1 discloses the use of samples comprising the entire amplificate and of universal (nonspecific) primers (see page 4, line 8 - page 5, line 17; page 8, line 14 - page 9, line 16; page 12, line 13 - page 13, line 7; page 14 - page 20, line 28).

A process having the features of Claims 1, 4, 6, 7, 10-14 and 16-19 is known from D4. D4 discloses the use of samples that comprise the entire length of the sequence between the amplification primers and of nonspecific and immobilized samples and primers (see column 8, line 22 - column 9, line 5; column 10, line 26 - column 11, line 30; column 17, line 48 - column 18, line 61, Examples 1 and 3).

Further, the subject matter of Claims 15, 20 and 22 is known from D5, D7 and D8 and D9, respectively.

D5 discloses the detection of amplification products mass-spectroscopically (see page 15, line 18 - page 16, line 4; page 41, line 15 - page 44, line 22; Figures 5 and 21; Example 5). D7 discloses the simultaneous amplification of a 67 and an 81 bp fragment (see Figure 1). D8 discloses the detection of HBV mutations by analysing the restriction patterns of amplification products; wild-type and mutant fragments (<100 bp) are simultaneously amplified (see page 4, line 50 - page 6, line 40). D9 discloses the use of Sequence No. 128 to detect HCV, this sequence being >80% homologous to Sequence No. 9 in the present application.

The subject matter of Claims 15, 20 and 22 therefore fails to meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

The embodiment as per Claim 5 does not appear to contain any additional feature that could be considered inventive, since amplification of viruses or viroids routinely involves short amplification products (see D6, D7 or D8).



Claims 8 or 9 pertain to routine embodiments of a process for detecting nucleic acids (see D2 or D3). The subject matter of these claims therefore appears to lack inventive step.

The feature described in Claim 21 - the simultaneous production of amplificates of nucleic acids of HIV, HBV and HCV - represents a possibility that a person skilled in the art would consider according to circumstances without inventive input in order to solve the problem.

The subject matter of Claims 5, 8, 9 and 21 therefore fails to meet the requirements of PCT Article 33(3).





**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted

Pursuant to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description should cite the documents D1-10 and briefly outline the relevant prior art contained therein.



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claim 22 contains a reference to the description or the drawings. Pursuant to PCT Rule 6.2(a), claims may contain such references only when absolutely necessary, which is not the case here.



# GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLAUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

## PCT

An

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

- Patentabteilung -  
D-68298 Mannheim  
ALLEMAGNE

K	Roche Diagnostics GmbH					Ad
	Patentabteilung					Hil
Jg	0 3. März 2000					Wu
Si						Bo
Kn						Wb
P	Kö	Köl	S	Sz	Im	

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLAUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS  
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

0 1. 03. 00

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
4817/OA/WO-Kn

**WICHTIGE MITTEILUNG**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP98/06952

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
03/11/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
04/11/1997

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d  
Fax +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Digiusto, M

Tel +49 89 2399-8162





VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4817/OAWO-Kn	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06952	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/11/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  09/03/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  01.03.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Linker, W  Tel Nr +49 89 2399 8703  





I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-59                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-25                      eingegangen am                      24/12/1999    mit Schreiben vom    22/12/1999

**Zeichnungen, Blätter:**

1/8-8/8                      ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,              Seiten:  
☐ Ansprüche,                Nr.:  
☐ Zeichnungen,              Blatt:

3. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

**siehe Beiblatt**

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.  
☒ Ansprüche Nr. 24, 25.

Begründung:



- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 24, 25 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

#### IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
  - ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
  - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
  - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
  - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
  - ☐ erfüllt ist
  - ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
  - ☒ alle Teile.
  - ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.



**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	5, 8, 9, 21
	Nein: Ansprüche	1-4, 6, 7, 10-20, 22
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-22
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-22
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**



Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Die mit Schreiben vom 22.12.99 eingereichten Änderungen bringen Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34 (2) b) PCT über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen. Es handelt sich dabei um folgende Änderungen:

Anspruch 1: oder weniger als 3 Nukleotide,

Anspruch 5: die Gesamtlänge der des Amplifikats 74 Nukleotide nicht überschreitet,

Anspruch 16: daß mindestens einer der Primer nicht für die Gruppe von Organismen spezifisch ist, der der nachzuweisende Organismus angehört, sowie die Gegenstände der Ansprüche 24 und 25.

Die unter Punkt IV, V und VIII gemachte Feststellung bezieht sich daher auf die ursprünglich vorgelegten Ansprüche 1-22.

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche 1, 15, 16, 20 und 22 sind durch kein gemeinsames technisches Merkmal verbunden, das einen Beitrag jeder beanspruchten Erfindung als Ganzes zum Stand der Technik bestimmt, es wird daher zwischen den vorgenannten Ansprüchen keine gemeinsame erfinderische Idee verwirklicht.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung





Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: WO 91 10675 A (STICHTING RES FONDS PATHOLOGIE) 25. Juli 1991 (1991-07-25)
- D2: US-A-5 538 848 (LIVAK KENNETH J ET AL) 23. Juli 1996 (1996-07-23)
- D3: EP-A-0 070 685 (STANDARD OIL CO) 26. Januar 1983 (1983-01-26)
- D4: US-A-5 527 898 (BAUER HEIDI M ET AL) 18. Juni 1996 (1996-06-18)
- D5: WO 96 29431 A (SEQUENOM INC) 26. September 1996 (1996-09-26)
- D6: EP-A-0 229 701 (CETUS CORP) 22. Juli 1987 (1987-07-22)
- D7: CHELLY J ET AL: 'Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glia cells.' NATURE, (1990 MAR 1) 344 (6261) 64-5. , XP002108801
- D8: EP-A-0 593 789 (SUMITOMO METAL IND) 27. April 1994 (1994-04-27)
- D9: WO 92 19743 A (CHIRON CORP) 12. November 1992 (1992-11-12)
- D10: WO 96 35437 A (IMMUNO AG ;EIBL JOHANN (AT); SCHWARZ OTTO (AT); DORNER FRIEDRICH () 14. November 1996 (1996-11-14)

Ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren mit den Merkmalen der Ansprüche 1-4, 10-12, 14, 16, 17 und 19 ist bereits aus D1 bekannt. D1 offenbart die Verwendung von Proben, die das ganze Amplikon umfassen, sowie universelle (unspezifische) Primer (siehe Seite 4, Zeile 8 - Seite 5, Zeile 17; Seite 8, Zeile 14 - Seite 9, Zeile 16; Seite 12, Zeile 13 - Seite 13, Zeile 7; Seite 14 - Seite 20, Zeile 28).

Ein Verfahren mit den Merkmalen der Ansprüche 1, 4, 6, 7, 10-14 und 16-19 ist aus D4 bekannt. D4 offenbart die Verwendung von Proben, welche den gesamten Bereich der Sequenz zwischen den Amplifikationsprimern umfassen, sowie unspezifische und immobilisierte Proben und Primer (siehe Spalte 8, Zeile 22 - Spalte 9, Zeile 5; Spalte 10, Zeile 26 - Spalte 11, Zeile 30; Spalte 17, Zeile 48 - Spalte 18, Zeile 61, Beispiele 1 und 3).

Weiterhin sind die Gegenstände der Ansprüche 15, 20 und 22 aus den Dokumenten D5, D7, D8 bzw. D9 bekannt.

D5 offenbart den Nachweis der Amplifikationsprodukte mittels Massenspektroskopie, siehe Seite 15, Zeile 18 - Seite 16, Zeile 4; Seite 41, Zeile 15 - Seite 44, Zeile 22; Abbildungen 5 und 21; Beispiel 5. D7 offenbart die gleichzeitige Amplifikation eines 67 und eines 81 bp Fragments, siehe Abbildung 1. D8 offenbart den Nachweis von HBV Mutationen durch Analyse der Restriktionsmuster von Amplifikationsprodukten, wildtyp



und mutante Fragmente (< 100 bp) werden gleichzeitig amplifiziert, siehe Seite 4, Zeile 50 - Seite 6, Zeile 40. D9 offenbart die Verwendung der Seq. ID Nr. 128 zum Nachweis von HCV, diese Sequenz hat >80 % Übereinstimmung mit der Seq. ID Nr. 9 der vorliegenden Anmeldung.

Die Gegenstände der Ansprüche 15, 20 und 22 erfüllen daher nicht die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT.

Die Ausführungsform gemäß Anspruch 5 scheint kein zusätzliches Merkmal zu enthalten, was als erfinderisch angesehen werden könnte, da kurze Amplifikationsprodukte üblich sind, wenn Viren oder Viroide amplifiziert werden, siehe D6, D7 oder D8.

Die Ansprüche 8 oder 9 betreffen übliche Ausgestaltungen eines Nachweisverfahrens für Nukleinsäuren (siehe D2 oder D3). Der Gegenstand dieser Ansprüche scheint daher nicht erfinderisch zu sein.

Bei dem Merkmal des Anspruchs 21, Amplifikate der Nukleinsäuren von HIV, HBV und HCV gleichzeitig herzustellen, handelt es sich um eine Möglichkeit, die der Fachmann ohne erfinderisches Zutun den Umständen in Betracht ziehen würde, um die gestellte Aufgabe zu lösen.

Die Gegenstände der Ansprüche 5, 8, 9 und 21 erfüllen daher nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT.

#### **Zu Punkt VII**

#### **Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1-D10 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

#### **Zu Punkt VIII**



**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Der Anspruch 22 enthält eine Bezugnahme auf die Beschreibung bzw. die Zeichnungen. Gemäß Regel 6.2 a) PCT dürfen Ansprüche nur dann Bezugnahmen enthalten, wenn dies unbedingt erforderlich ist, was hier nicht der Fall ist.



## Patentansprüche

### 1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte

- Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann,
- Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und
- Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde,

dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine oder weniger als 3 Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören und die Amplifikate kürzer als 100 Nukleotide sind.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer oder beiden Bindesequenzen der Primer überlappt.
3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer an seinem nicht verlängerbaren Teil Nukleotide aufweist, die nicht direkt mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement hybridisieren.
4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge der des Amplifikats 74 Nukleotide nicht überschreitet.





6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer immobilisierbar und die Sonde nachweisbar markiert ist.
7. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
5 mindestens einer der Primer nachweisbar und die Sonde immobilisierbar markiert oder immobilisiert ist.
8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.
- 10 9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Primer durch eine erste Energietransferkomponente und die Sonde durch eine zweite, davon verschiedene Energietransferkomponente markiert ist.
10. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß  
15 das Amplifikat durch physikalische und/oder spektroskopische Methoden detektiert wird.
11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
- 20 13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.
- 25 15. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Amplifikate mittels Massenspektroskopie erfolgt.



16. Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte

- Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer,
- Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und
- Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde,

dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die Gruppe von Organismen spezifisch ist, der der nachzuweisende Organismus angehört und die Amplifikate kürzer als 100 Nukleotide sind.

10 17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.

15 19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.

20 20. Verfahren zur gleichzeitigen Herstellung von Amplifikaten von Teilen von Nukleinsäuren, bei dem Primer eingesetzt werden, die eine Amplifikation dieser Teile mit den unterschiedlichen Sequenzen erlauben, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer so ausgewählt werden, daß die gebildeten Amplifikate in ihrer Länge um nicht mehr als 20 % unterscheiden und nicht länger als 100 Nukleotide sind.

21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig Amplifikate von Nukleinsäuren von HIV, HBV und HCV hergestellt werden.

25 22. Verfahren zum Nachweis von HCV, dadurch gekennzeichnet, daß zwei Primer und eine Sonde verwendet werden, deren Sequenzen aus Sequenzen von fortlaufenden Basen der unten dargestellten HGBV-Sequenz, hierzu komplementären Sequenzen oder Sequenzen mit mehr als 80% Identität zu diesen Sequenzen entnommen sind:



5'-GTACTGCCTG ATAGGGTCCT TGCGAGGGGA TCTGGGAGTC  
TCGTAGACCG TAGCACATG-3'.

23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß HCV-RNA nachgewiesen wird.

5

24. Verfahren zum Nachweis mehrerer Nukleinsäuren umfassend die Schritte

- gleichzeitige Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten von Teilstücken dieser Nukleinsäuren mit Hilfe von Paaren zweier Primer, von denen je einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-

10

- Richtung von A gelegenen Sequenz im wesentlichen komplementär ist, binden kann, wobei die Primer so ausgewählt sind, daß sich die gebildeten Amplifikate in ihrer Länge um nicht mehr als 20 % unterscheiden und nicht länger als 100 Nukleotide sind,

15

- Inkontaktbringen der jeweiligen Amplifikate mit je einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und

- Nachweis der Bildung eines Hybrids aus einem Amplifikat und einer Sonde,

wobei die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine oder weniger als 3 Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören und die Amplifikate kürzer als 100 Nukleotide sind.

20

25. Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig Amplifikate von Nukleinsäuren von HIV, HBV und HCV hergestellt werden.



**Claims**

1. Method for the detection of a nucleic acid comprising the steps

- producing a plurality of amplificates of a section of this nucleic acid with the aid of two primers, one of which can bind to a binding sequence (A) of one strand of the nucleic acid and the other can bind to a binding sequence C' which is essentially complementary to a sequence C which is located in the 3' direction from A and does not overlap A,
- contacting the amplificates with a probe having a binding sequence D which can bind to a sequence B located between the sequences A and C or to the complement thereof, and
- detecting the formation of a hybrid of the amplificate and probe,

wherein the sequence located between the binding sequences A and C contains no nucleotides that do not belong to the sequence region E formed from the binding sequence D of the probe and the sequence of the amplificate bound thereto.

2. Method as claimed in claim 1, wherein the binding sequence D of the probe overlaps one or both binding sequences of the primers.





3. Method as claimed in one of the previous claims, wherein at least one of the primers has nucleotides in its non-extendible part which do not hybridize directly with the nucleic acid to be detected or with its complement.
4. Method as claimed in one of the previous claims, wherein at least one of the binding sequences is not specific for the nucleic acid to be detected.
5. Method as claimed in one of the previous claims, wherein the total length of the binding sequences from the part of the binding sequence of the one primer which faces away from the binding sequence of the probe up to the part of the other primer which also faces away from the binding sequence of the probe is less than 100 nucleotides.
6. Method as claimed in one of the previous claims, wherein at least one of the primers is immobilizably-labelled and the probe is detectably-labelled.
7. Method as claimed in one of the previous claims, wherein at least one of the primers is detectably-labelled and the probe is immobilizably-labelled or is immobilized.
8. Method as claimed in one of the previous claims, wherein the probe is labelled with a fluorescence quencher as well as with a fluorescent dye.



9. Method as claimed in one of the previous claims, wherein one of the primers is labelled with a first energy transfer component and the probe is labelled with a second energy transfer component which is different from the first energy transfer component.
10. Method as claimed in one of the previous claims, wherein the amplificate is detected by physical and/or spectroscopic methods.
11. Method as claimed in one of the previous claims, wherein at least one of the primers is not specific for the nucleic acid to be detected.
12. Method as claimed in claim 11, wherein two of the primers are not specific for the nucleic acid to be detected.
13. Method as claimed in one of the claims 11 and 12, wherein the probe is not specific for the nucleic acid to be detected.
14. Method as claimed in one of the previous claims, wherein nucleotides which are each complementary to A, G, C and T are used in the amplification.
15. Method for the detection of a nucleic acid comprising the steps
  - producing a plurality of amplificates of a section of this nucleic acid with the aid of two primers one of which can bind to a binding sequence A of the nucleic acid and the other can



bind to a binding sequence C' which is complementary to a sequence C located in the 3' direction from A which does not overlap with A, and the amplificates are detected by means of mass spectroscopy.

16. Method for the specific detection of a nucleic acid comprising the steps

- producing a plurality of amplificates of a section of this nucleic acid with the aid of at least two primers,
- contacting the amplificates with a probe which can bind to the amplificate and
- detecting the formation of a hybrid of the amplificate and the probe,

wherein at least one of the primers is not specific for the nucleic acid to be detected.

17. Method as claimed in claim 16, wherein two of the primers are not specific for the nucleic acid to be detected.

18. Method as claimed in one of the claims 16 and 17, wherein the probe is not specific for the nucleic acid to be detected.



19. Method as claimed in one of the claims 16 to 18, wherein nucleotides which are each complementary to A, G, C and T are used in the amplification.
20. Method for the simultaneous production of amplificates of parts of nucleic acids in which primers are used which allow an amplification of these parts having different sequences, wherein the primers are selected such that the amplificates that are formed do not differ by more than 20 % in length and are not longer than 100 nucleotides.
21. Method as claimed in claim 20, wherein amplificates and nucleic acids of HIV, HBV and HCV are produced simultaneously.
22. Method for the detection of HCV, wherein primers and probes are used whose sequences are derived from sequences of consecutive bases of the HGBV sequences of fig. 7, complementary sequences thereto or sequences that are more than 80 % identical to these sequences.





**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation:</b> C12Q 1/68		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 99/23249
		<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b>	14. Mai 1999 (14.05.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT EP98 06952		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 3. November 1998 (03.11.98)			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 48 690.8 4. November 1997 (04.11.97) DE 198 14 001.0 28. März 1998 (28.03.98) DE 198 14 828.3 2. April 1998 (02.04.98) DE		<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b>			
<b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schlossbergweg 11, D-82057 Icking (DE). HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). BARTL, Knut [DE/DE]; Am Westend 6, D-82407 Wielenbach (DE). ØRUM, Henrik [DK/DK]; Vildrosevej 3, DK-3500 Værløse (DK).			
<b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			
<b>(54) Title:</b> SPECIFIC AND SENSITIVE METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACIDS			
<b>(54) Bezeichnung:</b> SPEZIFISCHES UND EMPFINDLICHES NUKLEINSÄURENACHWEISVERFAHREN			
<b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a method for detecting a nucleic acid comprising the production of a plurality of amplifications of a section of said nucleic acid with the assistance of two primers of which one can bond on a bonding sequence A of the nucleic acid and the other can bond on a bonding sequence C' which is complementary to a sequence C. Sequence C does not overlap A and is situated in a 3' direction from A. The inventive method also includes bringing the amplifications in contact with a probe having a bonding sequence D which can bond on a sequence B, said sequence B being situated between sequences A and C, or the complement thereof. In addition, the invention relates to the detection of the construction of a hybrid out of the amplification and the probe, whereby the sequence situated between the bonding sequences A and C contains no nucleotides, said nucleotides not being linked to the bonding sequence D of the probe or to complement D' thereof.</p>			
<b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz A der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C komplementär ist, binden kann. Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an eine zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde, wobei die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht der Bindesequenz D der Sonde oder ihrem Komplement D' zugehören.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## SPEZIFISCHES UND EMPFINDLICHES NUKLEINSÄURENACHWEISVERFAHREN

- 5     Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, bei dem eine Amplifikation eines Teilstückes dieser Nukleinsäuren vorgenommen wird und wobei dieses Teilstück im Hinblick auf seine Basensequenz bestimmte Bedingungen erfüllen muß, sowie ein Reagenzkit enthaltend zwei Primer und eine Sonde, die dieses Teilstück definieren.
- 10    Eine der meist angewandten molekularbiologischen Techniken zum Nachweis von Nukleinsäuren ist Hybridisierung mit sequenzspezifischen Sonden zum Nachweis homologer Nukleinsäure-Sequenzen. Der Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen ist von Bedeutung im Grundlagenbereich, jedoch von besonderer Bedeutung in verschiedenen Anwendungsfeldern, z. B. in den Bereichen medizinische Diagnostik,
- 15    forensische Diagnostik, Lebensmitteldiagnostik, Umweltdiagnostik, Pflanzenschutz und Tiermedizin.

- Als Sonde werden dabei entweder Oligonukleotide (kurze DNA oder RNA) oder Polynukleotide (längere DNA oder RNA) verwendet. Dabei haben die kürzeren Sonden gegenüber den längeren Sonden den Vorteil größerer Sequenzselektivität, wegen des
- 20    kürzeren Hybridisierungsbereichs aber den Nachteil geringerer Sensitivität. Eine verbesserte Sensitivität und Sequenzselektivität wird mit PNA-Sonden (Peptidnukleinsäuren, z. B. WO 92/20702) erreicht, da diese Sonden eine höhere Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren haben (höherer  $T_m$ ) und durch eine höhere Basendiskriminierung gekennzeichnet sind ( $\Delta T_m$ ). Zusätzlich können Sonden zum
- 25    Nukleinsäure-Nachweis Markierungsgruppen tragen, die entweder zum Fangen und/oder zur Detektion von Hybridkomplexen aus Sonde und nachzuweisender Nukleinsäure geeignet sind.

Zum Nukleinsäure-Nachweis durch Hybridisierung werden eine oder mehrere Sonden entweder zur Hybridisierung in Lösung oder auf festen Trägern verwendet. Bei Nukleinsäure-Nachweisen in Lösung spricht man von homogenen Nachweisformaten, bei Nachweis auf festen Trägern und/oder vermittelt durch feste Träger von heterogenen Nachweisformaten. Bei den heterogenen Nachweisverfahren (z. B. dot blot) kann die nachzuweisende Nukleinsäure auf dem festen Träger vorgebunden sein. Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen mit einer Lösung, die die Sonde enthält. Umgekehrt kann die Sonde auf dem festen Träger vorgebunden sein (z. B. reverse dot blot). Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen der gebundenen Sonde mit einer Lösung, welche die nachzuweisende Nukleinsäure enthält. Alternativ dazu kann der Komplex aus nachzuweisender Nukleinsäure und Sonde erst in Lösung gebildet werden und die Bindung an den festen Träger erst anschließend erfolgen. Bei homogenen Testformaten werden z. B. Sondenpaare verwendet, die endständig energieübertragende Gruppen tragen und die über Co-Hybridisierung an die nachzuweisende Nukleinsäure in unmittelbaren Kontakt gebracht werden und dadurch ein Signal erzeugen. Alternativ dazu können auch Sonden verwendet werden, die nach Bindung an die nachzuweisende Nukleinsäure durch enzymatische 5'-Nukleaseaktivität in Lösung von einem gequenchten in einen ungequenchten Zustand überführt werden.

Der Nachweis von Nukleinsäuren durch alleinige Sonden-Hybridisierung hat nur begrenzte Sensitivität. So ist selbst mit empfindlichen Detektions-Markierungsgruppen wie  $^{32}\text{P}$ , Digoxigenin, Biotin, Fluorescein, Ruthenium-Chelate, Fluorescein, Rhodamin oder AMCA allein nur eine Sensitivität in pg- bis fg-Bereich möglich. Zum empfindlichen Nukleinsäure-Nachweis gerade im medizinisch-diagnostischen Bereich sind jedoch Sensitivitäten im ag-Bereich und eine hohe Nachweisspezifität notwendig. Dies gilt sowohl für den Nachweis von körperfremden Nukleinsäuren z. B. in Form von Infektionserregern, als auch für den Nachweis der An- oder Abwesenheit oder Veränderung körpereigener Nukleinsäuren. Hohe Nachweissensitivität und Nachweisspezifität ist aber auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

So müssen manche Infektionserreger wie z. B. HCV, HIV und HBV schon in wenigen Kopien nachgewiesen werden, um rechtzeitig erfolgreiche medizinische Interventionsmaßnahmen, z. B. durch frühzeitige Arzneimittelbehandlung, ansetzen zu können. Für solch frühzeitige Nachweise von Infektionserregern ist der Nachweis von

5 Nukleinsäure-Sequenzen der Infektionserreger von Vorteil, da wegen der Verfügbarkeit von Nukleinsäure-Vervielfältigungstechniken (Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren) ein empfindlicher Nachweis schon in einer frühen Infektionsphase (Latenzphase) möglich ist. Die Möglichkeit der gezielten Vermehrung des nachzuweisenden Agens gibt es nur im Fall von Nukleinsäuren, nicht aber im Fall von immunologischen

10 Nachweisverfahren. Bei diesen Verfahren ist eine Steigerung der nachzuweisenden Infektionserreger-spezifischen Partikel nur über die humorale Immunantwort über Bildung von entsprechenden Infektionserreger-spezifischen Antikörpern möglich; diese Immunantwort erfolgt jedoch erst nach Ablauf der Latenzzeit und ist eine

15 Sekundärreaktion nach Infektion durch den Erreger. Daher hat der Nachweis über Nukleinsäure-Hybridisierung den Vorteil, daß z. B. der Infektionserreger direkt nach Infektion und sehr empfindlich nachgewiesen werden kann.

Der Erfolg von medizinischen Interventionsmaßnahmen ist jedoch auch davon abhängig, daß der Infektionserreger nicht nur frühzeitig mit hoher Sensitivität, sondern auch sehr spezifisch nachgewiesen werden kann. Zur gezielten Behandlung ist daher

20 eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Infektionserregern, wie z. B. HAV, HBV, HCV, HIV, verschiedene Herpes-Viren, HPV, sowie die Unterscheidung einzelner Subtypen, wie z. B. HIV-1 und HIV-2, von Bedeutung. Dabei ist aber auch entscheidend, daß quantitative Aussagen gemacht werden können und keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse erhalten werden, da solche falschen

25 Ergebnisse u.U. gravierende therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen können. Dies setzt Richtigkeit und hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse voraus. Daher muß der Nukleinsäure-Nachweis nicht nur sehr sensitiv, sondern auch sehr spezifisch und reproduzierbar sein. Der spezifische und sensitive Nukleinsäure-Nachweis muß auch rasch erfolgen, damit eine gezielte Therapie umgehend erfolgen kann.

- Oftmals ist auch von Bedeutung, mehrere Infektionserreger wie z. B. HCV, HIV und HBV nebeneinander nachzuweisen, z. B. im Rahmen von Blutbanken-Screeningtests. Dies erfolgt bei derzeit gängigen Nukleinsäure-Nachweistests durch hintereinandergeschaltete Einzelbestimmungen der nachzuweisenden Infektionserreger.
- 5 Dies hat den Nachteil, daß mehrere Bestimmungen hintereinander durchgeführt werden müssen, was gerade beim Screening von großen Specimen-Stückzahlen nachteilig ist. Im Rahmen dieser Nukleinsäure-Bestimmungen ist wünschenswert, sensitive und spezifische Testmöglichkeiten verfügbar zu haben, die z. B. eine rasche parallele Bestimmung mehrerer Infektionserreger nebeneinander in einer einzigen Probe
- 10 ermöglichen (Multiplex-Bestimmung).

- Beim Nachweis der An- oder Abwesenheit von körpereigener Nukleinsäure innerhalb bestimmter genomischer Loci und/oder deren Veränderungen, wie z. B. ererbte, spontane oder eine Mischung aus ererbten und spontanen Mutationen, Deletionen, Inversionen, Translokationen, Rearrangements oder Triplett-Expansionen in Form von
- 15 spezifischen und/oder polymorphen Veränderungen, ist ebenfalls die Verfügbarkeit spezifischer und sensitiver Nukleinsäure-Nachweisverfahren von Vorteil. Die Verfügbarkeit spezifischer und sensitiver Nukleinsäure-Nachweisverfahren ist jedoch nicht nur im medizinischen Sektor sondern auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

- 20 Die bisherigen Testverfahren zum sensitiven und spezifischen Nachweis der An- oder Abwesenheit von Nukleinsäuren basieren auf der kombinierten Durchführung von Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen (Nukleinsäure-Vermehrung) und Nukleinsäure-Nachweisreaktionen (Detektion).

- Die nachzuweisende Nukleinsäure wird dabei in einer für die Vermehrungsreaktionen
- 25 zugänglichen Form eingesetzt, z. B. in Form von unbehandeltem oder behandeltem Probenmaterial und/oder Probenmaterial-Konzentrierung, z. B. durch Adsorption des unbehandelten oder behandelten Probenmaterials an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen. Durch diese festen Träger erfolgt keine

substantielle Reinigung und oder Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und oder Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer  
5 nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugänglichen Form möglich.

Andere Probenvorbereitungs-Verfahren enthalten gezielte Verfahrensschritte zur Nukleinsäure-spezifischen und/oder sequenzspezifischen Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. die Verwendung von festen Trägern mit Nukleinsäure-spezifischen  
10 Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-Fangsonden zur selektiven Bindung und Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure durch Nukleinsäure-spezifische Bindung und anschließende Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure. Bei dieser Art von festen Trägern sind Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-  
15 Fangsonden an der Oberfläche der festen Träger notwendig. Daher sind zur Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, entweder mehrere feste Träger notwendig, was aufwendiger ist, oder feste Träger mit einer oder mehreren Bindungsgruppen und/oder mit multiplen oder mehreren Fangsonden. Multiple Fangsonden enthalten mehrere Bindungs-  
20 sequenzen für mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Diese Träger mit mehreren Bindungsgruppen und/oder mehreren und/oder multiplen Fangsonden sind jedoch aufwendiger herzustellen. Ebenfalls sind die Reaktionsbedingungen zur gezielten Bindung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren an Träger mit mehreren Bindungsgruppen und/oder Fangsonden schwieriger einzustellen bzw. die Bindung mehrerer  
25 nachzuweisender Nukleinsäurearten an eine Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppe oder an eine Fangsonde mit mehreren komplementären Hybridisierungssequenzen schwieriger einzustellen.

Die Vermehrung und der Nachweis der bereitgestellten nachzuweisenden Nukleinsäuren erfolgt in heterogenen oder homogenen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisformaten.  
30 Die Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen und Detektionreaktionen können entweder

hintereinander (heterogene Testverfahren) oder gleichzeitig (homogene Testverfahren) erfolgen. Als Vermehrungsreaktionen werden entweder targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, targetabhängige Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen oder Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Die Verwendung von

5 Detektionssystemen zum Nachweis der vermehrten Nukleinsäuren erfolgt entweder über den Einbau von Nukleotiden und/oder die Verwendung von markierten Primern oder markierten Sonden. Die verwendeten Detektionssysteme enthalten entweder direkte oder indirekte Detektionsmarkierungen bzw. gekoppelte sekundäre und tertiäre Nachweiskomponenten. Die Detektion der vermehrten nachzuweisenden Nukleinsäuren

10 kann jedoch auch durch spektroskopische oder physikalische Methoden erfolgen.

Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen haben den Nachteil geringer Sensitivität wegen der nicht-exponentiellen Signalvermehrung, erhöhten Störanfälligkeit durch stärkere Tendenz zur Hintergrundsignalbildung durch die Vielzahl der Sondenkomponenten und

15 der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein daran gekoppeltes Detektionssignal targetunabhängig vermehrt wird. Beispiele sind gekoppelte Signalkaskaden (z. B. SELF-Zyklus) oder signalgebende Sonden-Baum- oder -Bürstenstrukturen (z. B. branched DNA).

20 Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten targetabhängigen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen sind wegen der exponentiellen Signalvermehrung zwar sensitiver als die reinen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren, haben aber wiederum den Nachteil der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende Nukleinsäure selbst, sondern lediglich

25 ein davon in einer einleitenden targetabhängigen Primärreaktion abgeleitetes Detektionssignal in Form eines Nukleinsäure-Reportermoleküls Targetsequenzunabhängig enzymatisch vermehrt wird. Beispiele sind die Q $\beta$ -Replikationsreaktion, bei der ein Q $\beta$ -Reportermolekül enzymatisch vermehrt wird, oder die Ligase-Kettenreaktion, bei der Teilstücke der Nukleinsäure-Reportermoleküle

30 sequenzunabhängig enzymatisch verknüpft werden.



Als Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der bisher sensitivsten und spezifischsten exponentiellen targetspezifischen Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie z. B. PCR (US-A-4,683,202 bzw EP-B-0 202 362), RT-PCR, SDA, NASBA (EP-A-0 329 822) oder TAM (WO 91/01384), wurden bisher jeweils einzel- oder doppelstrangige

5 Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte durch targetsequenzabhängige thermozyklische oder isotherme enzymatische Elongation gegenläufige Primer, die sequenzspezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind und an die Enden der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit (Amplikon) der nachzuweisenden Desoxyribo- oder Ribo-

10 Nukleinsäuren oder deren Komplemente binden und somit die Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte begrenzen, erzeugt. Bei diesen Elongationsreaktionen werden alle 4 Basenspezifitäten eingebaut

Die genannten Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierter targetspezifischer Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion sind wegen Targetsequenz-abhängiger enzymatischer Nukleinsäure-Vermehrungszyklen am spezifischsten. Während lineare

15 targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, wie z. B. die Cycling-Probe-Reaktion, nur zu begrenzter Sensitivität führen, ergeben exponentielle targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie Elongations-basierte Reaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, RT-PCR, SDA) oder Transkriptions-basierte Reaktionen wie z. B. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder

20 Transcription Mediated Amplification (TMA) bisher die sensitivsten und spezifischsten Signale.

Mischformen zwischen targetabhängiger Signal-Nukleinsäure-Vermehrung und targetspezifischer Nukleinsäure-Vermehrung, wie z. B. die Gap-filling Ligase-Kettenreaktion (gap-filling LCR, WO 90/01069), haben zwar gegenüber der nicht-

25 modifizierten LCR einen targetabhängigen Reaktionsschritt, dieser ist aber begrenzt auf limitierte Sequenzabschnitte bestehend aus lediglich 1 oder 2 Basenspezifitäten und damit limitierterer Target-Spezifität.

Für den Nachweis der entstandenen Nukleinsäure stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Der Nachweis der gebildeten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte über Fragment- oder Sequenz-Gelanalyse ist zeitaufwendig und nicht quantitativ. Der Nachweis über trägergebundene Dot-, Slot- oder Reverse-Dot-Blot-Verfahren ist  
5 ebenfalls zeitaufwendig und nicht quantitativ.

- Quantitative sensitive und spezifische Bestimmungen der nachzuweisenden Nukleinsäuren wurden bisher im Rahmen von heterogenen oder homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten möglich, bei denen das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt entweder durch eingebaute  
10 Label oder durch Hybridisierung mit einer für die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement spezifischen Sonde in einem Teil des durch Elongation entstandenen Sequenzabschnitts abgefangen wird. Exponentielle Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformate, bei denen eine Interkalation von Nukleinsäure-bindenden Farbstoffen erfolgt, sind zwar auch sensitiv, aber nicht sequenzspezifisch.
- 15 Bei den heterogenen Reaktionsformaten wird das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt z. B. entweder über eine Primer-Fangmodifikation oder durch eine immobilisierte Fangsonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist, auf einen festen Träger gebunden und über Einbau eines detektionsmarkierten Nukleotids, durch Hybridisierung mit einer detektionsmarkierten  
20 Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist, oder über eine Primer-Detektionsmodifikation nachgewiesen. In homogenen Reaktionsformaten erfolgte bisher der Nachweis z. B. über die Hybridisierung einer Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist und die einen gequenchten Fluoreszenz-Label  
25 trägt, wobei die Targetsequenz-abhängige enzymatische Aufhebung der Quenchung durch die Primer-Elongations-bedingte Freisetzung des gequenchten Fluoreszenz-markierten Nukleotids erfolgt (WO 92/02638), oder über die Anlagerung und/oder Interkalation eines detektierbaren Moleküls oder einer detektierbaren Gruppe.

Bei allen bisherigen quantitativen sensitiven und spezifischen heterogenen und homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten wurden bisher Nukleinsäure-Vermehrungseinheiten (Amplikons) verwendet, die neben den spezifischen Primer- und Sonden-Bindungssequenzen  
5 zusätzliche Sequenzen variabler Länge zwischen den flankierenden Primer-Bindungssequenzen und der internen Sonden-Bindungssequenz enthielten. Diese fünfgeteilte Amplikonsstruktur resultierte in Amplikonlängen größer als die Summe der Sequenzlängen der beiden flankierenden Primer und der internen Sonde zwischen vorzugsweise 100 und 1000 Basen(paaren). Optimierungen der Nukleinsäure-  
10 Vermehrungsreaktion durch verbesserte Enzymmischungen gingen bisher vielmehr hauptsächlich in Richtung längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte.

Kürzere Amplikonlängen wurden bisher lediglich zum Nachweis spezieller Sequenzen wie z. B. bei Triplet-Expansionen, für In-situ-Untersuchungen oder den Nachweis stark fragmentierter Nukleinsäuren im Rahmen der Altertumsforschung erzeugt. Diese kurzen  
15 Amplikon-Längen wurden jedoch in zeitaufwendigeren Gelformaten oder In-situ-Formaten detektiert, die durch mangelnde Sensitivität und/oder fehlende Quantifizierung gekennzeichnet sind. Andere spezielle kurze Sequenzen wie Short Tandem Repeats, Short Interspersed Repetitive Elements Microsatellite Sequences oder HLA-spezifische Sequenzen, wurden bisher lediglich als Primer- oder Sonden-  
20 Bindungssequenzen verwendet, bzw. in Kombination mit anderen Sequenzen.

Die fünfgeteilten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben den Nachteil, daß sie neben den spezifisch Primer und Sonde bindenden Sequenzen noch zusätzliche Sequenzen beinhalten, die das Amplikon verlängern und die Gesamtspezifität im Hinblick auf die Spezifitäts-generierenden Primer- und Sonden-Bindungsreaktionen  
25 reduzieren.

Die bisher verwendeten längeren fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben ferner den Nachteil längerer Primer-Elongationszeiten und damit längere Gesamt-Testzeiten. Die Sensitivität ist auch begrenzt durch Plateaueffekte der beteiligten Enzyme und Substrate, die bei längeren Amplikons früher erreicht werden. Ein weiterer

- Nachteil längerer Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte ist eine zunehmende  
Kompetition zwischen Amplikon-Gegenstrang und Detektor- oder Fangsonde und somit  
reduzierter Sensitivität. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Möglichkeit der  
unspezifischen Bindung bedingt durch die zusätzlichen Sequenzen mit der Folge eines  
5 erhöhten Hintergrunds und dadurch geringerer Sensitivität (geringeres Signal-Rausch-  
Verhältnis). Ein weiterer Nachteil bei der Bindung des Nukleinsäure-  
Vermehrungsprodukts an trägergebundene Fangsonden ist die sterische und kinetische  
Hinderung längerer Nukleinsäure-Moleküle; daher werden Nukleinsäure-  
Vermehrungsprodukte bisheriger Länge vor der Bindung durch die Fangsonde  
10 vorzugsweise fragmentiert. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Anfälligkeit gegenüber  
Fragmentierung innerhalb der Amplikonsequenz und dadurch Zerstörung der  
Nukleinsäure-Vermehrungseinheit; dies führt zu geringerer Reproduzierbarkeit. Ein  
weiterer Nachteil ist, daß längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei niedrigen  
Testtemperaturen von z. B. 37 °C, die bei gängigen Nukleinsäure-Analysegeräten  
15 vorgegeben sind, weniger spezifisch hybridisieren, da eine größere Differenz zur  
Schmelztemperatur besteht. Ein weiterer Nachteil von fünfteiligen Nukleinsäure-  
Vermehrungsprodukten ist beim Nachweis mehrerer verschiedener Nukleinsäure-  
Vermehrungsprodukte, daß unterschiedliche Nukleinsäure-Vermehrungslängen gebildet  
werden, die einen Multiplex-Nachweis erschweren.
- 20 Ziel der vorliegenden Erfindung war es, ein alternatives Nachweisverfahren für  
Nukleinsäuren bereitzustellen, welches Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen  
Verfahren hat.

- Eine spezielle Aufgabe der Erfindung bestand darin, ein targetabhängiges exponentielles  
Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren zum hochsensitiven, hochspezifischen,  
25 reproduzierbaren und quantifizierbaren Nachweis einer oder mehrerer einzelsträngiger  
oder doppelsträngiger Nukleinsäuren bereitzustellen, welches insbesondere einen oder  
mehrere der genannten Nachteile vermeidet.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war, unter Erhalt der Gesamtspezifität die Auswahl  
der Primer- und Sondensequenzen so flexibel zu gestalten, daß eine Bestimmung

mehrerer verschiedener nachzuweisender Nukleinsäuren in einem vereinheitlichten Reaktionsformat unter Verwendung von vorzugsweise teilweise gleichen Primer- oder Sonden-Sequenzen möglich ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von  
5 Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C dieses Stranges im wesentlichen komplementär ist, binden kann. Inkontaktbringen der Amplifikate mit  
10 einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon keine Nukleotide enthält, die nicht dem  
15 aus der Bindesequenz D der Sonde und der hieran gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens.

In Fig. 1 ist schematisch die in der vorliegenden Beschreibung verwendete  
20 Bezeichnungsweise für die Bereiche auf der nachzuweisenden Nukleinsäure gezeigt.

In Fig. 2 ist die entsprechende Bezeichnungsweise für die intermediär gebildeten Verlängerungsprodukte der Primer sowie die Amplifikate (Amplikons) gezeigt. Ebenfalls ist gezeigt, daß die Amplifikate ein oder mehrere weitere Bereiche Y aufweisen können, die außerhalb des Bereiches liegen, der die von der nachzuweisenden  
25 Nukleinsäure stammende Sequenzinformation enthält.

In Fig. 3 ist schematisch gezeigt, wie im Falle der vorliegenden Erfindung die Bindesequenzen der Primer und Sonde angeordnet sind. Es ergeben sich verschiedene Alternativen I bis VI, je nachdem, ob und wie die Bindesequenzen überlappen. Es ist

jeweils nur ein Strang des Amplifikats gezeigt. Dieselbe Anordnung (nur komplementär) kann für einen zweiten Strang des Amplifikats erstellt werden. Für die intermediär gebildeten Verlängerungsprodukte ergibt sich ein ähnliches Bild. Als Fall V und VI ist der Fall gezeigt, daß die Sonde neben der Bindesequenz D noch weitere, nicht mit dem Amplifikat Basenpaarungen ausbildende Bereiche X enthält, die gleich oder verschieden sein können. Zum Vergleich ist der Fall des Standes der Technik als VII gezeigt; die Sequenzen Z repräsentieren die zusätzlichen Sequenzen der fünfteiligen Amplikons.

In Fig. 4 sind Sequenzen der benutzten Bereiche eingezeichnet, nämlich A', B und C.

10 In Fig. 5 ist die Synthese von 5'-5'-verknüpften Primern schematisch gezeigt.

In Fig. 6 sind die in Fig. 5 verwendeten Verbindungen gezeigt.

In Fig. 7 ist eine für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders geeignete Region des HCV-Genoms gezeigt sowie eine Sequenz, aus welcher die Primer- und Sonden- Sequenzen bevorzugt ausgewählt werden. Diese zweite Sequenz ist dem nicht humanpathogenen Virus HGBV-B entnommen. Bei den hieraus gewählten Primer- und Sondensequenzen handelt es sich daher um nicht für HCV spezifische Sequenzen (J. Med. Virol. 48: 60-67).

In Fig. 8 bis 10 sind bevorzugte Sequenzen für Primer und Sonden zum HCV-Nachweis gezeigt.

20 Nukleinsäuren, welche mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden können, können beliebigen Ursprungs sein, beispielsweise Nukleinsäuren viroiden, viralen, bakteriellen oder zellulären Ursprungs oder von Hefen oder Pilzen. Proben (Specimen), in denen die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement enthalten sind, sind z. B. humane, tierische, bakterielle oder pflanzliche Flüssigkeiten, oder Flüssigkeiten aus Hefen oder Pilzen, Exkremente, Abstriche, Zellsuspensionen, Kulturen oder Gewebs-, Zell- oder Flüssigkeits-Punktionen. Bevorzugt liegen die Nukleinsäuren in Lösung vor. Damit das erfindungsgemäße Verfahren seine Vorteile voll entfalten kann, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, wenn

die nachzuweisende Nukleinsäure eine Größe von mindestens 40 bp aufweist. Die Nukleinsäure kann auch eine durch Klonierung, Amplifikation, in-vitro- und in-vivo-Vermehrung hergestellte Nukleinsäure sein.

- Die nachzuweisende Nukleinsäure kann einzelsträngig (insbesondere bei RNA) oder
- 5 doppelsträngig (insbesondere bei DNA) sein. Für den Fall doppelsträngiger Nukleinsäuren können beide Stränge vermehrt werden oder aber auch nur einer. Aus beiden Sorten von Nukleinsäuren können einzel- oder doppelsträngige Amplifikate gebildet werden, wovon einer oder beide zum weiteren Nachweis verwendet werden können. Entsprechend wird die Sequenz der Sonde oder der Sonden ausgewählt.
- 10 Der Probe oder einer Kontrollprobe können positive oder negative Kontrollnukleinsäuren oder Quantifizierungsstandards zugesetzt sein, die ähnlich oder gleich behandelt werden wie die nachzuweisenden Nukleinsäuren. Als Standards können beispielsweise interne oder externe heterologe oder homologe DNA- oder RNA-
- 15 Standards, enthaltend Primer-Bindesequenzen homologe und zu den Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäuren heterologe Sonden-Bindesequenzen, verwendet werden. Umgekehrt ist aber auch die Verwendung von besonders im 3'-Priming-Bereich heterologen Primer-Bindesequenzen und homologen Sonden-Bindesequenzen möglich. Als Negativ-Kontrollen werden bevorzugt analoge Specimen eingesetzt, welche die nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement nicht enthalten.
- 20 Vor der Vermehrung wird die Probe bevorzugt einem oder mehreren Vorbehandlungsschritten unterzogen, um die nachzuweisenden Nukleinsäuren in eine vermehrungsfähige Form zu bringen. In einem ersten optionalen Schritt findet eine Vorbehandlung der Probe (Specimen) statt, durch welche die Probe in eine Form gebracht wird, aus der die nachzuweisende Nukleinsäure in eine für die Überführung der
- 25 vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung geeignete Form gebracht wird (z.B. Abtrennung störender Bestandteile aus der Probe).

Die Art der Vorbehandlung der Probe hängt von der Art der Probe und der Komplexität des biologischen Materials in der Probe ab. Bei humanen Körperflüssigkeiten wie z. B. Human-Blut erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform zunächst eine Abtrennung

von Blutzellen zur Erzeugung von Plasma, Serum oder Blutzellkonzentraten. Durch diesen Trennschritt wird durch die Probenvorbehandlung die Komplexität des biologischen Probenmaterials in den resultierenden Fraktionen deutlich reduziert, ohne daß eine substantielle Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäure erfolgt. Im Fall von

5 Sputum oder Abstrichen erfolgt eine Probenvorbehandlung, z. B. durch Suspendieren des Sputums bzw. des Abstrichs in einer Flüssigkeit, im Fall von Urin z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Im Fall von Gewebspunktionen erfolgt eine Probenvorbehandlung z. B. durch Suspendierung und Behandlung mit einem Zellverbands-auflösenden Agens. Bei Cerebrosidal-Flüssigkeit

10 erfolgt die Probenvorbehandlung z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Auch in diesen Fällen erfolgt durch die Probenvorbehandlung eine Reduktion der Komplexität des biologischen Probenmaterials.

Danach kann sich ein Schritt anschließen, in dem die nachzuweisende Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung zugängliche Form überführt wird.

15 Dabei werden bevorzugt bekannte Methoden angewandt. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt in einem ersten Reaktionsschritt eine Lysebehandlung der vorbehandelten Probe zur Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. durch Proteinase K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribonukleinsäuren durch Alkali. In einem zweiten Schritt wird die durch Lyse vorbehandelte Probe nach

20 Zugabe von chaotropen Agentien, wie z. B. Guanidinium-Hydrochlorid oder Harnstoff, in An- oder Abwesenheit von löslichen Alkoholen, wie z. B. Isopropanol, an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger konzentriert. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen (z. B. Magnetpartikel, Glasvliese mit glashaltigen Oberflächen, Partikel,

25 Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäße, Dip-sticks oder miniaturisierte Reaktionskammern, die wiederum auch Teil von integrierten Reaktionschips sein können). Durch diesen festen Träger erfolgt bevorzugt eine nicht-sequenzspezifische Reinigung, d.h. keine substantielle Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren von anderen Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-(Nukleinsäuren-)Konzentrierung

30 und ggf. Inaktivierung und/oder Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden



Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäure, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugängliche Form möglich.

- 5 In einer anderen Ausführung kann die Überführung der nachzuweisenden Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe nach Nukleinsäure-Freisetzung in einem ersten Schritt durch z. B. Proteinase K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribonukleinsäuren durch Alkali erfolgen. In einem zweiten Schritt wird die lysierte vorbehandelte Probe zur Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure mit festen
- 10 Trägern in Kontakt gebracht, die mit Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen und/oder Fangsonden spezifisch zur selektiven Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure modifiziert sind, und anschließend die gebundene nachzuweisende Nukleinsäure durch Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure wieder eluiert. Beispiele für
- 15 Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen sind PNA-Homopyrimidin-Oligomere wie z. B. (T)<sub>7</sub>-PNA oder Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Substanzen wie z. B. Nukleinsäure-Interkalatoren, Major groove-Binder oder Minor groove-Binder. Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind Nukleinsäure-Oligomere oder Nukleinsäure-Polymere mit Bindungssequenzen für eine oder mehrere
- 20 nachzuweisende Nukleinsäuren. Weitere Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind PNA-Oligomere mit Bindungssequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Die Bindung der Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen oder der Fangsonden an den festen Träger kann mit oder ohne Zwischenschaltung von Abstandshaltern (Spacern) entweder kovalent oder über
- 25 Bindungspaare, wie z. B. Biotin:Streptavidin oder Ni:Chelat erfolgen.

Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuresequenzen können linear oder zirkulär sein und können Sequenz-Modifikationen und/oder sonstige Modifikationen, wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon, enthalten oder methyliert, gecappt, polyadenyliert

30 oder in sonstiger Weise modifiziert sein. Die zur Vermehrung eingesetzten

Nukleinsäuren oder deren Komplement können natürlichen Ursprungs sein, fragmentiert, modifiziert oder enzymatisch, z. B. mit dem Enzym Uracil-Deglykosylase (UNG), oder physikalisch vorbehandelt, vorvermehrt, oder chemisch, photochemisch oder enzymatisch erzeugt sein, z. B. durch chemische Oligonukleotidsynthese oder in-  
5 vitro-Replikation, in-vitro-Reverse Transkription oder in-vitro-Transkription.

In dem ersten essentiellen Verfahrensschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure amplifiziert. Im Folgenden wird dieses Teilstück auch Amplikon genannt. Dieses enthält zwingend den Sequenzbereich zwischen den äußeren Enden der Bindesequenzen A und C' bzw. des Komplements  
10 davon der Primer (den Primerbindungsbereichen), und enthält den Bindebereich E der Sonde bzw. das Komplement davon. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Amplikon (bevorzugt die Gesamtlänge der Sequenzen der Bereiche A, B und C) bevorzugt kürzer als 100 Nukleotide, besonders bevorzugt kürzer als 60 Nukleotide, jedoch bevorzugt länger als 40 Nukleotide. Dies bedeutet jedoch nicht, daß die  
15 Gesamtlänge der Amplifikate nicht doch größer sein kann, z. B. wenn die Primer zusätzlich Nukleotide aufweisen. Es werden solche Vermehrungsmethoden eingesetzt, die eine Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement erlauben, die in der Bildung von Tripartite-Mini-Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten münden [Mini Chain Reaction (MCR)]. Hierfür stehen prinzipiell alle Nuklein-  
20 säureamplifikationsverfahren zur Verfügung, die im Stand der Technik bekannt sind. Bevorzugt werden targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Besonders bevorzugt werden theoretisch exponentielle targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet, bei denen eine antiparallele Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement erfolgt, wie z. B. Elongations-  
25 basierte Reaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR für Desoxyribonukleinsäuren, RT-PCR für Ribonukleinsäuren) oder Transkriptions-basierte Reaktionen wie z. B. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder Transcription Mediated Amplification (TMA). In besonderer Weise bevorzugt werden thermozyklische exponentielle Elongations-basierte Nukleinsäure-  
30 Vermehrungsreaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Die zur

Vermehrung eingesetzten nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement können in Form von einzelsträngigen oder doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren oder Ribonukleinsäuren vorliegen. Ziel der Vermehrungsreaktion (Amplifikation) ist die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks der nachzuweisenden Nukleinsäure. Unter einem Amplifikat wird daher jede unter Verwendung von Sequenz-

5 information der Nukleinsäure hergestellte Molekülspezies verstanden. Insbesondere handelt es sich um Nukleinsäuren. Der Begriff "Amplifikat" beinhaltet sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäuren. Ein Amplifikat kann neben den die Sequenzinformationen der zugrunde liegenden Nukleinsäure enthaltenden Bereichen

10 (Amplikon) außerhalb der voneinander wegweisenden Enden der Primerbindungsstellen noch weitere Bereiche enthalten, welche nicht in direkter Relation mit Sequenzen der zu amplifizierenden Nukleinsäure stehen. Bevorzugt kommen gerade solche Sequenzen einer Länge von mehr als 15 Nukleotiden nicht auf der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement vor und können mit dieser nicht durch direkte Basenpaarung

15 hybridisieren. Amplifikate können somit entweder mit der nachzuweisenden Nukleinsäure selbst oder mit deren Komplement hybridisieren. Amplifikate sind beispielsweise auch die Produkte einer asymmetrischen Amplifikation, d. h. einer Amplifikation, bei der die beiden Stränge in unterschiedlicher Menge gebildet werden (z. B. durch Einsatz unterschiedlicher Mengen an Primern) oder einer der beiden

20 Stränge wieder zerstört wird (z. B. durch RNase).

Unter einem Primer im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein Molekül verstanden, welches über Basenpaarungen an eine Nukleinsäure T oder deren Komplement binden kann und welches, bevorzugt enzymatisch, verlängert werden kann. Bevorzugt sind Oligonukleotide, die an ihrem 3'-Ende unter Verwendung der nachzuweisenden

25 Nukleinsäure oder einem Komplement hiervon als Templatnukleinsäure verlängert werden können. Als Primer können monovalente oder multivalente oder monofunktionelle oder multifunktionelle Agentien eingesetzt werden, die eine Nukleinsäure-abhängige Elongation zulassen. Diese Agentien können auch aus verschiedenen Molekülarten zusammengesetzt sein, z. B. Chimären aus PNA und

30 Nukleotid(en) oder aus Protein/Peptid und Nukleotid(en). Bevorzugt können als Primer

Oligomere oder Polymere einer Bindelänge von zwischen 9 und 30 nt, besonders bevorzugt zwischen 11 und 22 nt verwendet werden, die an die nachzuweisende Nukleinsäure T oder deren Komplement antiparallel binden und die als einer von mehreren Reaktionspartnern für eine enzymatische Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement wirken. Besonders bevorzugt werden als Primer Oligomere verwendet, die nach Zugabe eines Vermehrungsreagenzes durch Anlagerung zumindest eines Teils des Primers an die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement eine gerichtete Replikation einer oder beider Stränge der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement initiieren. Ein Beispiel für einen besonders bevorzugten Primer ist ein Oligonukleotid mit einem freien 3'-Hydroxyl-Ende.

Die als Primer eingesetzten Agentien können eine oder mehrere Bindesequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren oder deren Komplement enthalten und können Sequenz-Modifikationen, endständige und/oder interne Sequenzergänzungen und/oder sonstige Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon, nicht funktionelle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon enthalten oder methyliert, gecappt oder polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein. Erforderlich ist, daß sie die geforderten Bindeeigenschaften zur nachzuweisenden Nukleinsäure bzw. ihrem Komplement haben und verlängerbar sind. Bevorzugte Nukleotid-Äquivalente sind PNA-Monomere bzw. PNA-Oligomere (WO 92/20702) mit oder ohne positive und/oder negative Ladungen im Rückgrat und/oder im Abstandshalter. Die als Primer eingesetzten Agentien können Modifikationen tragen, die entweder direkt oder indirekt über ein weiteres Bindungspaar zur Detektion und/oder Bindung an einen festen Träger geeignet sind. Bevorzugte Primer-Modifikationen sind die Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Fluorescein, Rhodamin, AMCA oder Derivate davon, einen Partner in einem der Bindungspaare Biotin:(Strept-)Avidin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin gekoppelt mit Äquorin, Fluorescein: Anti-Fluorescein oder Ruthenium- oder Rhenium-Chelat oder Äquorin. Eine besonders bevorzugte Primer-Modifikation ist Biotin als Fang- oder Detektions-Modifikation. Die Primer können weitere Sequenzbereiche Y enthalten, insbesondere an

ihrem 5'-Ende (Fig. 2). Hier sind sowohl 5'-3'-Verknüpfungen als auch 5'-5'-  
Verknüpfungen und/oder 5'-2'-Verknüpfungen möglich. Außerdem können sie  
zusätzliche Strukturkomponenten, wie z. B. Abstandshalter, immobilisierbare Gruppen  
oder Löslichkeits-vermittelnde Molekülteile oder im Hinblick auf Primingaktivität  
5 aktivierbare Bereiche haben, wie z. B. AP-Stellen.

Unter einer Sonde wird ein Molekül verstanden, welches aufgrund von Basen-Basen-  
Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren hybridisieren kann. Bevorzugte Sonden sind  
daher Oligonukleotide sowie basenhaltige Nukleinsäuremimetica, wie  
Peptidnukleinsäuren (PNA). Die Länge einer Sonde beträgt, bezogen auf die  
10 Bindesequenz D, bevorzugt zwischen 9 und 30 Basen.

PNA-Oligomer-Sonden mit oder ohne positive oder negative Ladungen im Rückgrat  
und/ oder Abstandshalter haben die zusätzlichen Vorteile, daß sie stabil sind gegenüber  
dem Abbau von Nukleasen oder Proteasen wegen der verschiedenen Struktur des  
Rückgrats und der H- bzw. NH<sub>2</sub>-Enden, einen höheren Schmelzpunkt in  
15 Bindungskomplexen zwischen Nukleinsäuren und PNA als zwischen zwei  
Nukleinsäure-Molekülen aufwiesen und der Hybridkomplex dadurch stabiler ist, bei  
niedrigen Salzkonzentrationen anwendbar sind, eine höhere Differenz der  
Schmelzpunkte bei Fehlpaarungen aufwiesen und somit eine bessere Fehlpaarungs-  
Diskriminierung möglich ist, Sequenzen mit Sekundärstrukturen bei niedrigen  
20 Salzkonzentrationen zugänglicher sind, die Konkurrenz zwischen Amplikon-Ge-  
genstrang und Sonde geringer ist bei niedrigen Salzkonzentrationen und dadurch eine  
höhere Signalausbeute erreicht wird und das Potential zur Eliminierung des Amplikon-  
Denaturierungsschritts bei niedrigen Salzkonzentrationen besteht.

Als Sonden können monovalente oder multivalente Agentien eingesetzt werden, die  
25 eine Bindung vermehrungsabhängiger Elongationsprodukte und/oder vermehrter  
Nukleinsäuresequenzen zulassen. Bevorzugt können als Sonden Oligomere oder  
Polymere verwendet werden, die an die nachzuweisende Nukleinsäure antiparallel  
binden. Besonders bevorzugt werden als Sonden Oligomere verwendet, die durch  
Anlagerung zumindest eines Teils der Sonde an die nachzuweisende Nukleinsäure oder

deren Komplement eine im Rahmen der Folgereaktionen stabile Bindung an einen oder beide Stränge der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement herbeiführen. Die Oligomere können sowohl 5'-3'-Verknüpfungen als auch 5'-5'-Verknüpfungen und/oder 5'-2'-Verknüpfungen sowie zusätzliche Strukturkomponenten, wie z. B.

5 Abstandshalter oder Löslichkeits-vermittelnde Molekülteile, enthalten.

Unter einer Bindesequenz wird bevorzugt die Sequenz von Basen verstanden, die zwischen den äußersten, mit einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde über Basen-Basen-Wechselwirkung bindenden Basen einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde liegt, einschließlich dieser äußersten

10 Basen.

Die als Sonde eingesetzten Agentien können eine oder mehrere Bindesequenzen D für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren oder deren Komplement, insbesondere jedoch für einen Strang des Amplifikats enthalten und können Sequenz-Modifikationen, endständige und/oder interne Sequenzergänzungen und/oder sonstige

15 Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon, nicht funktionelle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon enthalten oder methyliert, gecappt oder polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein, solange die Bindung an einen Strang des Amplifikats möglich ist. Bevorzugte Nukleotid-Äquivalente sind PNA-Monomere bzw.

20 PNA-Oligomere mit oder ohne positive und/oder negative Ladungen im Rückgrat und/oder Abstandshalter. Die als Sonden eingesetzten Agentien können Modifikationen tragen, die entweder direkt oder indirekt über ein weiteres Bindungspaar zur Detektion und/oder Bindung an einen festen Träger geeignet sind. Bevorzugte Sonden-Modifikationen (nachweisbare Gruppen L, immobilisierbare Gruppen I) sind die Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Fluorescein, Rhodamin, AMCA oder Derivate davon, Bindungspaare Biotin:(Strept-)Avidin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin gekoppelt mit Äquorin, Fluorescein:Anti-Fluorescein oder Ruthenium-Chelat oder Äquorin. Besonders bevorzugte Sonden-Modifikation sind Biotin als Fang- oder Detektions-Modifikation, Digoxigenin, Ruthenium- oder

25 Rhenium-Chelat oder Äquorin als Detektions-Modifikationen.

30

In der vorliegenden Erfindung wird das Teilstück der Nukleinsäure, von welchem eine Vielzahl von Amplifikaten hergestellt werden soll, so ausgewählt, daß es drei Bereiche A, B und C enthält. Die Bereiche A und C sind Bereiche, die so gewählt werden, daß der eine Primer die Sequenz A als Bindesequenz benutzen kann und das Komplement des Bereiches C als Bindesequenz für den anderen Primer dienen kann. Unter einem Komplement wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine zu einer bestimmten anderen Nukleinsäure, z. B. einem Sequenzbereich z. B. eines Amplifikats oder der nachzuweisenden Nukleinsäure im wesentlichen komplementäre Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenz verstanden.

10 Im wesentlichen komplementär bedeutet, daß die Basenpaarungen so gewählt sind, daß (für den Fall, daß eine Hybridisierung mit einer anderen Nukleinsäure, z. B. einer Sonde oder einem Primer) eine Hybridisierung unter den Testbedingungen noch erfolgen kann bzw. (für den Fall eines Verlängerungsprodukts eines Primers im Verhältnis zu dem eingesetzten Templat) die Nukleinsäure aufgrund einer Primerverlängerungsreaktion  
15 unter Verwendung der entsprechenden Nukleinsäure gebildet werden konnte. Im wesentlichen komplementär bedeutet daher oft, daß unter stringenten Bedingungen mehr als 90 % der Basen der betrachteten Nukleinsäure bzw. Sequenz mit der bestimmten Nukleinsäure bzw. Sequenz Basenpaarungen ausbilden.

Die Bereiche A und C sind erfindungsgemäß bevorzugt so lang, daß Bedingungen  
20 gefunden werden können, bei denen Primer einer entsprechenden Länge mit den Basen in diesen Bereichen hybridisieren können. Daher sind die Bereiche bevorzugt länger als 8, besonders bevorzugt länger als 12 Nukleotide. Auch bezüglich der Obergrenze der Länge der Bereiche A und C ergeben sich im Sinne der Erfindung bevorzugte Bereiche. Die Bereiche A und C sind jeweils bevorzugt kleiner als 30, besonders bevorzugt  
25 kleiner als 20 Nukleotide. Die Länge der Bereiche wird in einem besonderen Aspekt der Erfindung dadurch nach oben begrenzt, daß die Primer in für die nachzuweisende Nukleinsäure unspezifischer Weise daran hybridisieren können sollen. Daher ist die besonders bevorzugte Länge der Bindesequenzen A und C 12 bis 20 Nukleotide. Die Bereiche A und C auf der nachzuweisenden Nukleinsäure überlappen nicht miteinander.

Im Sinne der Erfindung enthalten das Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure (welches dem Amplikon entspricht) und somit die hieraus gebildeten Amplifikate eine zwischen den Bereichen A und C gelegene Sequenz B (Fig. 1 bis 3). Diese Sequenz hat eine Länge von ein oder mehr Nukleotiden, bevorzugt mehr als 4, besonders bevorzugt mehr als 8 Nukleotide. Nach oben hin ist die Länge der Sequenz B durch die geforderte Nichtanwesenheit von Nukleotiden, die nicht der Bindesequenz der Sonde zugehören, und in einem besonderen Aspekt der Erfindung durch die gewünschte Unspezifität der Sonde begrenzt. Bevorzugt ist die Sequenz B daher kleiner als 30, besonders bevorzugt kleiner als 15 Nukleotide. Die Sequenz B hat bevorzugt eine Länge von zwischen 4 und 30 Nukleotiden. Besonders bevorzugt ist die Länge der Sequenz B zwischen 8 und 15 Nukleotiden. Diese Sequenz oder das Komplement davon dienen im Sinne der Erfindung mit zur Bindung der Sonde. Die Länge der Sonde wird so gewählt, daß eine Hybridisierung mit dem Amplifikat möglich ist. Die Sequenz der Sonde wird so gewählt, daß sie eine Bindesequenz D enthält, welche durch die mit dem Amplikon Basen-Basen-Wechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde, insbesondere den zwischen den äußersten mit korrespondierenden Basen des Amplikons Basenwechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde definiert ist. Bevorzugt ist die Sonde im wesentlichen komplementär zu den Nukleotiden der Bindesequenz E des Amplifikats. Die Bindesequenz D bzw. deren Komplement D' kann zu dem Amplifikat zu 100 % komplementär sein, aber auch Mismatches (Fehlpaarungen) zwischen den äußeren Enden der Bindesequenz aufweisen. Die Sonde kann neben der Bindesequenz weitere Gruppen oder Reste oder auch Nukleinsäure-bindende Bereiche enthalten (Fig. 3, V, VI).

Abhängig von der Länge des Bereiches B und der Länge der Bindesequenz D bzw. D' lassen sich unterschiedliche Fallgestaltungen treffen. In einem ersten Fall ist die Bindesequenz D oder D' länger als der Bereich B bzw. B' des Amplikons. In diesem Fall reicht die Bindesequenz D bzw. D' in einen oder beide Bereiche A bzw. A' und C bzw. C' des Amplikons hinein. Diese Fälle sind in Fig. 3, II bis IV gezeigt. In diesen Fällen enthält das Amplifikat zwischen den voneinander wegweisenden Enden der Bereiche A und C keine Nukleotide, die nicht der Bindesequenz E oder den Bindesequenzen der



Primer zugehören. Die Bindesequenz D der Sonde überlappt in Fig. 3, II und III mit einer der beiden Bindesequenzen der Primer.

In einem weiteren Fall entspricht die Länge des Bereiches B der Länge des Bereiches D, so daß die Bindesequenz der Sonde nicht mit den Bindesequenzen der Primer überlappt  
5 (Fig. 3, I).

Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet in einer bevorzugten Ausführungsform die Bildung von dreiteiligen Mini-Amplikons (Tripartite-Mini-Amplikon), die neben den Primer und Sonde bindenden Sequenzen keine zusätzlichen Sequenzen aufweisen und somit die Nachteile bei Bildung von längeren Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten  
10 vermeiden, wobei andererseits die Spezifität des gesamten Amplifikationsformats durch Bindung der Primer, durch Bindung der Sonde und durch Ablauf der targetabhängigen enzymatischen Elongationsreaktion mit allen 4 Nukleotid- bzw. Basenspezifitäten oder natürlicher oder artifizieller Analoga, Isomere oder Äquivalente davon aber sichergestellt wird. Das erfindungsgemäße Vermehrungsverfahren wird daher auch als  
15 Mini-Chain-Reaction (MCR) bezeichnet.

Die Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement erfolgt, wenn im folgenden nichts anderes ausgesagt ist, unter Befolgung der dem Fachmann bekannten Reaktionsschritte und Reaktionsbedingungen. Ein Unterschied zu den herkömmlichen Verfahren ist der Einsatz der speziell ausgewählten Primer und  
20 SONDENSEQUENZEN, welche die Bildung und Vermehrung des Mini-Tripartite-Amplikons erlauben. Wesentlich im Sinne der Erfindung ist die Zugabe von eines oder mehrerer Primer, die an die Primer-Bindesequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäure, des Tripartite-Mini-Amplikons beziehungsweise deren Komplemente binden.

Allgemein üblich ist die Zugabe zur Vermehrung befähigender Vermehrungsreagentien.  
25 Bevorzugt können als Vermehrungsreagentien enzymatisch aktive Komponenten (z. B. Enzyme) in Kombination mit Elongationssubstraten und geeignete Hilfsreagentien (wie Puffer) verwendet werden. Bevorzugte Elongationssubstrate sind Nukleinsäurebausteine oder natürliche oder artifizielle Analoga oder Isomere oder Äquivalente davon. Als Elongationssubstrate werden Agentien eingesetzt, die zum

Aufbau eines Gegenstrangs der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignet sind. Bevorzugt werden als Elongationssubstrate Nukleotide eingesetzt. Bevorzugte Nukleotide sind dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP, dITP, iso-dGTP, iso-dCTP, deaza-dGTP und ATP, GTP, CTP, UTP und/oder ITP, deazaGTP, iso-GTP, iso-CTP.

- 5 Äquivalente sind PNA-Monomere bzw. PNA-Oligomere mit oder ohne positive und/oder negative Ladung im Rückgrat und/ oder im Abstandshalter. Die Elongationssubstrate können, wie oben ausgeführt, Modifikationen tragen.

Besonders bevorzugt werden im Fall der PCR als Nukleinsäure-Vermehrungsreagentien Mischungen aus meta- oder thermostabilen enzymatischen DNA-Polymerase-

- 10 Aktivitäten und Mischungen von Desoxyribo- und/oder Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagentien verwendet, z. B. Taq-DNA Polymerase in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien. Besonders bevorzugt werden im Fall der RT-PCR als Vermehrungsreagentien Mischungen, Komplexe oder Domänen aus thermostabilen
- 15 enzymatischen Reverse Transkriptase- und DNA-Polymerase-Aktivitäten und Mischungen von Desoxyribo- und Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagentien verwendet, z. B. Mischungen aus AMV oder Mo-MLV-Reverse Transkriptase oder Tth-DNA Polymerase in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und ATP, GTP, CTP, UTP und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien.
- 20 Bei den thermostabilen Vermehrungsreaktionen (z. B. PCR, RT-PCR) werden 2- oder 3-phasige Zyklen durchgeführt, bevorzugt 2-phasige Zyklen. Bei den 2-phasigen Zyklen wird die Strangtrennung der Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei hoher Temperatur, bevorzugt 85 °C - 95 °C, durchgeführt, das gemeinsame Primer-Annealing und Primer-Elongation bei Temperaturen nahe dem Schmelzpunkt zwischen Primer und
- 25 Elongationsgegenstrang, bevorzugt zwischen 52 °C und 75 °C. Die Strangtrennung erfolgt durch Energiezufuhr und/oder enzymatisch, bevorzugt durch erhöhte Temperatur, Mikrowellen oder das Anlegen einer Spannung über eine Mikroelektrode, besonders bevorzugt durch erhöhte Temperatur. Es werden bis zu 60 Thermozyklen durchgeführt, bevorzugt 32 - 42 Zyklen. Bei den isothermen Vermehrungsreaktionen
- 30 (z. B. SDA) wird eine kontinuierliche Inkubation bei einer mittleren Temperatur

- zwischen 30 °C und 70 °C durchgeführt, bevorzugt bei 37 °C - 45 °C mit Enzymmischungen, Komplexen oder Domänen, bzw. 60 °C - 65 °C mit mesothermen Enzymmischungen, Komplexen oder Domänen, im Fall von SDA mit z. B. mesothermen Restinktionendonukleasen und DNA-Polymerasen, z. B. aus *Bacillus* 5 *stearothermophilus* (z. B. BsoBI/Bst DNA-Pol exo); alternative Enzyme sind Ava I und Bca DNA-Pol exo. Es wird bis zu 2 Stunden inkubiert, bevorzugt 30 - 60 Minuten. Die Vermehrungsreaktion kann in Reaktionsgefäßen, Kapillaren oder miniaturisierten Reaktionskammern erfolgen, die auch Teil eines integrierten Reaktionschips sein können.
- 10 Bei Verwendung von dUTP anstelle von oder in Ergänzung zu dTTP wird durch die DNA-Polymerase-Aktivität dUMP anstelle von dTMP in die vermehrte Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement eingebaut. Dies erlaubt durch Inkubation mit der Enzymaktivität Uracil-Deglycosylase, bevorzugt mit einer thermolabilen Ausführungsform der Enzymaktivität, bei der die Renaturierung nach thermischer
- 15 Denaturierung der Enzymaktivität langsamer erfolgt, die Fragmentierung des Vermehrungsprodukts und somit seiner Eigenschaft als Nukleinsäure-Vermehrungseinheit. Die Inkubation des UMP-haltigen Vermehrungsprodukts kann im Anschluß an die Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktion (Sterilisierung) und/oder vor einer erneuten Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion (Carry over-Prävention) erfolgen.
- 20 Alternativ können auch Psoralen und/oder Isopsoralen und Derivate davon und Bestrahlung mit UV-Licht zur funktionellen Inaktivierung des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts verwendet werden.
- Im Fall von NASBA und TMA können als Nukleinsäure-Vermehrungsreagentien bevorzugt Mischungen, Komplexe oder Domänen aus enzymatischen Reverse
- 25 Transkriptase-, DNA-Polymerase, RNase H und RNA-Polymerase und Mischungen von Desoxyribo- und Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagentien verwendet werden, z. B. eine Mischung aus AMV oder Mo-MLV-Reverse Transkriptase, ggf. *E. coli* DNA-Polymerase, ggf. *E. coli* RNase H und T7-, T3- oder SP6-codierte RNA-Polymerase oder Mo-MLV Reverse Transkriptase und T7-, T3- oder SP6-RNA-Polymerase oder

entsprechende mesostabile Enzyme, z. B. aus *Bacillus stearothermophilus* in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und ATP, GTP, CTP, UTP, und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien. Der Reaktionsverlauf der Vermehrungsreaktion bei NASBA, TMA ist isotherm.

- 5 Der Nachweis der Bildung der Amplifikate erfolgt mit der Sonde, die an die Binde-  
sequenz B des Amplikons zu einem Hybrid bindet. Die Sonde kann als Fang- oder  
Detektionssonde fungieren. Die Enden der Bindesequenz der Sonde liegen zwischen  
den äußeren Enden der Primer-Bindesequenzen. Die Sonde ist somit hybridisierbar mit  
einem Strang des Amplifikats.
- 10 Die Bindung der Sonde kann unter Benutzung bekannter Bedingungen geschehen. Denn  
bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle  
Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem  
Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit  
experimentelle Details im Folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf  
15 "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press,  
1986, z. B. in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of  
Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in  
Molecular Biology, Ed. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, und Molecular  
Cloning, Ed. J. Sambrook et al., CSH, 1989, Bezug genommen. Zu den bekannten  
20 Methoden gehört auch die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten  
Oligonukleotiden und die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine  
Spezifität erreicht werden kann, die unter anderem vom Ausmaß der Homologie  
zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge  
abhängt.
- 25 Hierzu wird, wenn die Fangsonde (in geschützter Form) nicht schon vorher zugegeben  
wurde, die Sonde zu der Reaktionsmischung nach der Vermehrungsreaktion, bevorzugt  
in Form einer Lösung, zugegeben. Dabei werden Reagenzbedingungen eingestellt, die  
eine Hybridisierung der Sonde mit einem Amplifikat erlauben.

Die Bindung zwischen der vermehrten Nukleinsäuresequenz des Amplikons und oder dessen Komplement und der Sonde erfolgt bevorzugt bei einer konstanten Temperatur zwischen 20 °C und 75 °C, bevorzugt um 0 °C - 30 °C, besonders bevorzugt um 0 °C - 15 °C unterhalb der Schmelztemperatur des Bindekomplexes. Die Inkubationszeit beträgt bis zu 4 Stunden, bevorzugt 15 - 120 Minuten, besonders bevorzugt 30 - 60 Minuten. Die Bindung mit dem Amplifikat und/oder dessen Komplement erfolgt mit oder ohne vorausgehenden Denaturierungsschritt. Die Reaktionsführung ohne vorausgehenden Denaturierungsschritt erfolgt bevorzugt mit PNA-Oligomeren mit oder ohne negative und/oder positive Ladungen im Rückgrat und/oder im Abstandshalter bei niedrigen Salzkonzentrationen.

Bei Verwendung mehrerer Sonden oder multifunktionaler Sonden oder Sonden, die mehrere Bindesequenzen für Amplifikate verschiedener nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplemente aufweisen, können mehrere unterschiedliche Amplifikate oder deren Komplemente gebunden werden. Dabei erlaubt die Bildung von Tripartite-Mini-Amplikons bevorzugt ähnlicher Länge, besonders bevorzugt solcher Tripartite-Mini-Amplikons gleicher Länge, bei der Nukleinsäurevermehrung die Einstellung vereinheitlichter Inkubationsbedingungen für die Bildung der unterschiedlichen Bindekomplexe. Dies erlaubt den parallelen und/oder sequentiellen Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen im Rahmen von Multiplex-Verfahren.

Unter einem Multiplex-Amplifikationsverfahren wird meist ein Verfahren verstanden, bei dem entweder unterschiedliche Sequenzen auf einer Nukleinsäure (z. B. unterschiedliche Regionen eines Gens) oder aber unterschiedliche Sequenzen auf unterschiedlichen Nukleinsäuren, z. B. aus unterschiedlichen Organismen, z. B. unterschiedlichen Viren, gleichzeitig in einer Amplifikationsmischung vermehrt werden. Solche Verfahren stellen hohe Anforderungen an die Reaktionsbedingungen, da für eine zuverlässige Auswertung die Amplifikationen für die unterschiedlichen Sequenzen eine ähnliche Amplifikations-Effizienz haben müssen. Einen der Einflußfaktoren für unterschiedliche Effizienz auszuräumen, ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Dazu unterscheiden sich die Ampliconlängen bevorzugt um nicht mehr als 20 %, besonders bevorzugt um nicht mehr als 5 Nukleotide.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiplexverfahrens werden Amplicons der verschiedenen Sequenzen hergestellt und anschließend die Summe der gebildeten Amplicons bestimmt. Dabei wird bevorzugt ein Nachweisverfahren eingesetzt, bei dem eine Markierung für alle Nachweise verwendet werden kann; so können beispielsweise alle Sonden für die einzelnen Amplifikate gleich  
5 markiert sein, z. B. mit dem gleichen Ruthenium-Komplex. Dieses Vorgehen ist insbesondere für Tests in Proben aus Blutbanken vorteilhaft, da es bei der weiteren Verwendbarkeit der Proben für Blutspenden nicht auf die Art einer Infektion ankommt, sondern die Probe schon dann nicht mehr als Blutspendematerial in Frage kommt, wenn  
10 irgendeine getestete Infektion (z. B. HIV oder HBV) vorliegt.

Bei den Multiplex-Amplifikationsverfahren unterscheidet man zwischen echten und unechten Multiplex-Verfahren. Bei unechten Verfahren werden die Primer aus stark konservierten Regionen der Analytnukleinsäuren ausgewählt, derart, daß mit dem einen Set von (2) Primern alle nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen amplifiziert werden. Bei  
15 echten Multiplex-Verfahren wird ein Gemisch von mehr als 2 Primern eingesetzt, von denen mindestens 2 eine unterschiedliche Selektivität haben. Einer oder mehrere der Primer können für alle oder ein Untersatz von nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifisch sein. Dieses Verfahren ist insbesondere dann vorzuziehen, wenn wenig verwandte Sequenzen nebeneinander amplifiziert werden sollen.

20 Mit Multiplex-Verfahren können verschiedenste Kombinationen von nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen nebeneinander amplifiziert werden, z. B. verschiedene Subtypen eines Virus oder Bakterien verschiedener Genera oder Spezies.

Der Nachweis des gebildeten Bindekomplexes zwischen Amplifikat und Sonde kann in für den Fachmann bekannten Verfahren, insbesondere in verschiedenen  
25 Ausführungsformen erfolgen, nämlich direkten Nachweisverfahren, wie z. B. mit spektroskopischen oder physikalischen Methoden, durch Sequenzierung oder durch heterogene oder homogene Nachweisformate.

Direkte spektroskopische oder physikalische Verfahren sind z. B. Schmelztemperaturbestimmungen, Anlagerung von interkalierenden oder Nukleinsäure-bindenden

Farbstoffen oder Metallatomen oder -partikeln. Massenspektroskopie, Oberflächen-Plasmonenresonanz oder Fluoreszenz-gekoppelte Oberflächen-Plasmonenresonanz. oder E-wave-Messungen.

Die Sequenzierung des gebundenen Tripartite-Mini-Amplikons kann über Bindung des  
5 Primers und anschließende enzymatische Sequenzierung nach Sanger erfolgen. Zur Detektion der Sequenzierungsprodukte ist bevorzugt entweder der Primer markiert oder die Kettenabbruchreagentien. Die Sequenzierungsprodukte können auch über Massenspektroskopie nachgewiesen werden. Bei Zugabe lediglich limitierter Nukleotidarten entsprechend den flankierenden Nukleotiden am Primerende ist eine Minisequenzierung  
10 möglich, was besonders für die Analyse von Polymorphismen von Vorteil ist.

Bei den heterogenen Nachweisverfahren kann die Sonde abhängig von der angebrachten Modifikation entweder als Fangsonde oder als Detektorsonde verwendet werden. Bei Verwendung mehrerer Sonden sind Multiplexformate realisierbar.

Bei Verwendung der Sonde als Fangsonde kann die Sonde entweder an dem festen  
15 Träger kovalent oder über ein Bindungspaar vorgebunden sein und die Bildung des Bindekomplexes zwischen Amplifikat und der Sonde erfolgt auf dem festen Träger. Bei dieser Ausführungsform können neben festen Trägern, die eine Sondenart enthalten, auch feste Träger realisiert werden, die mehrere bzw. eine Vielzahl von Sondenarten enthalten, wie z. B. Sonden-Perlen bzw. Partikeln (sogenannte beads), Sonden-  
20 Teststreifen, Sonden-Panels oder Sonden-Arrays auf festen Trägern oder miniaturisierten Chips, die wiederum auch Teil von integrierten Reaktionschips sein können. Diese trägergebundenen Nachweissysteme sind besonders geeignet für Multiplexformate. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Komplex zwischen Amplifikat und Fangsonde in Lösung erst vorgebildet und anschließend auf den festen  
25 Träger aufgebracht. Hierzu enthält das Amplikon bevorzugt eine immobilisierbare Gruppe I, die an eine an einer Festphase befindlichen Gruppe R binden kann.

Die Art der Festphase richtet sich nach der zur Immobilisierung befähigenden Gruppe I. Bevorzugt weist sie eine immobilisierende Gruppe R auf, die eine bindende Wechselwirkung mit I eingehen kann. Ist die immobilisierbare Gruppe beispielsweise

- ein Hapten, dann kann eine Festphase verwendet werden, die an ihrer Oberfläche Antikörper gegen dieses Hapten aufweist. Ist die immobilisierbare Gruppe ein Vitamin, wie z. B. Biotin, dann kann die Festphase bindende Proteine wie Avidin oder Streptavidin immobilisiert enthalten. Besonders bevorzugte Reste I und R sind Biotin und Streptavidin. Die Immobilisierung über eine Gruppe an der modifizierten Nukleinsäure ist besonders vorteilhaft, da sie unter milderer Bedingungen stattfinden kann als beispielsweise Hybridisierungsreaktionen. Bevorzugt wird zur Immobilisierung der gebildeten Nukleinsäuren die Reaktionsmischung vor, während oder nach Bildung der Nukleinsäurehybride in ein Gefäß gefüllt, welches an seiner Oberfläche mit der immobilisierbaren Gruppe reagieren kann. Es ist möglich, eine Festphase in Form eines porösen Materials, wie einer Membran, eines Gewebes oder eines Vlieses, zu verwenden, auf welche die Reaktionsmischung aufgegeben wird. Ebenso ist die Verwendung von Perlen, sogenannten beads - z. B. Magnetpartikeln oder Latex-Partikeln - möglich. Das Gefäß ist bevorzugt eine Küvette, ein Röhrchen oder eine Mikrotiterplatte. Die feste Phase sollte mindestens so viele Bindungsstellen für die immobilisierbare Gruppe der Sonde haben wie Nukleinsäurehybride und damit nachzuweisende Nukleinsäuren vorhanden sind. Die Herstellung einer bevorzugten festen Phase ist in der EP-A- 0 344 578 beschrieben, auf welche vollinhaltlich Bezug genommen wird.
- Für die heterogenen Nachweisreaktionen wird nach der Inkubationszeit, während der die Immobilisierungsreaktion stattfindet, die flüssige Phase aus dem Gefäß, dem porösen Material oder den pelletierten beads entfernt. Die Festphase kann anschließend mit einem geeigneten Puffer gewaschen werden, da die Bindung der Hybride an der Festphase sehr effizient ist. Die Detektion der gebundenen Bindekomplexe kann über die während der Nukleinsäuresequenz-Vermehrungsreaktion eingebaute Detektionsmodifikation im Primer und/oder einem Nukleotid und/oder der Sonde mit Hilfe von bekannten direkten oder indirekten Nachweisarten für diese Modifikationen nach dem Stand der Technik erfolgen.
- Bei direkt nachweisbaren Gruppen, beispielsweise Fluoreszenzlabeln, kann die Menge an Markierung fluorometrisch bestimmt werden. Ist die nachweisbare Gruppe indirekt



- nachweisbar z. B. ein Hapten, so wird die modifizierte Nukleinsäure bevorzugt mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten umgesetzt, wie analog in der EP-A-(0) 324 474 beschrieben. Die Markierung am Antikörper kann beispielsweise eine Farb- oder Fluoreszenzmarkierung oder bevorzugt eine Enzymmarkierung, wie
- 5  $\beta$ -Galactosidase, alkalische Phosphatase oder Peroxidase, sein. Im Falle der Enzymmarkierung wird die Menge an Nukleinsäure über die meist photometrische, chemoluminometrische oder fluorometrische Verfolgung einer Reaktion des Enzyms mit einem chromogenen, chemoluminogenen oder fluorogenen Substrat gemessen. Das Meßsignal ist ein Maß für die Menge ursprünglich vorhandener nachzuweisender
- 10 Nukleinsäure und somit ggf. an nachzuweisenden Organismen.

- In einer bevorzugten Ausführungsform werden die vermehrten Tripartite-Mini-Amplifikons durch Nukleinsäure-Fangsonden oder PNA-Fangsonden gebunden, die kovalent auf Mikrotiterplatten oder Magnetpartikeln immobilisiert sind. Die Detektion erfolgt in dieser bevorzugten Ausführungsform nach Bildung des Bindekomplexes und
- 15 Waschen über eine Biotin-Modifikation eines oder beider Primer im Amplifikat durch Anlagerung von Avidin-Meerrettich-Peroxydase und einer Mischung aus TMB/TMF-Farbsubstraten.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Einbau einer Digoxigenin-Detektionsmarkierung über eines der Nukleotide der Nukleinsäure-
- 20 Vermehrungsreaktion. Der Bindekomplex zwischen Amplifikat und einer Biotin-markierten Nukleinsäure-Fangsonde oder PNA-Fangsonde wird auf die Oberfläche eines Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäßes gebunden. Nach Waschen erfolgt Anlagerung von Anti-Digoxigenin-Meerrettich-Peroxidase-Antikörperkonjugaten und Farbnachweis mit dem Farbsubstrat ABTS.

- 25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Nachweis einer oder mehrerer Amplifikate nach Bindung durch eine oder mehrere verschiedene kovalent (z. B. Anthrachinon: UV-Licht-Kopplung oder Gold-Oberfläche: SH-Kopplung) oder koordinativ (z. B. Biotin: Streptavidin) gebundene Fangsonden, durch Waschen und durch Detektion eines Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Signals, das entweder

direkt durch Primärlicht oder über Oberflächenplasmonresonanz oder E-wave angeregt wurde, mit Hilfe von z. B. CCD-Kameras oder konfokalen Fluoreszenz-Scannern.

Bei Verwendung der Sonde als Detektionssonde kann die Sonde entweder gleichzeitig, vor oder nach Bindung des Amplifikats an die feste Phase binden. In diesem Fall erfolgt  
5 die Bindung des Amplifikats an die feste Phase über Modifikationen, die über einen oder beide Primer oder über die eingebauten Nukleotide eingebaut wurden. Anschließend wird gewaschen und detektiert.

In einer weiteren Ausführungsform wird der Komplex zwischen Amplifikat und Detektionssonde in Lösung erst vorgebildet und anschließend auf den festen Träger  
10 aufgebracht und gewaschen. Die Detektion der Festphase-gebundenen Bindekomplexe zwischen Amplifikat und Detektionssonde erfolgt über die Detektionsmodifikation der Sonde mit Hilfe von bekannten direkten oder indirekten Nachweisarten für diese Modifikationen nach dem Stand der Technik.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden an die Amplifikate, die über einen oder  
15 beide Primer Biotin-Modifikationen enthalten, Ruthenium-Chelat-haltige Detektionssonden gebunden. Die Detektionssonden sind entweder Ruthenium-markierte Oligonukleotide oder Ruthenium-markierte PNA-Oligomere. Nach Bildung des Bindekomplexes zwischen Ruthenium-markierter Detektionssonde und Biotin-markiertem Amplifikat erfolgt Bindung des Komplexes an Streptavidin-beschichtete  
20 Magnetpartikel, Transfer in eine Meßzelle, Anlagerung an eine Elektrode innerhalb der Meßzelle und Erzeugung und Messung eines Elektrochemilumineszenz-Signals.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Detektions-Sonde mit Digoxigenin markiert. Nach Bildung des Bindekomplexes zwischen Digoxigenin-markierter Detektionssonde und Biotin-markiertem Amplifikat erfolgt die Bindung des  
25 Komplexes durch eine Fangsonde, die kovalent auf einer Mikrotiterplatte oder auf Magnetpartikeln immobilisiert ist. Die Detektion erfolgt in dieser bevorzugten Ausführungsform nach Bildung des Bindekomplexes und Waschen über eine Biotin-Modifikation eines oder beider Primer im Tripartite-Mini-Amplikon durch Anlagerung von Avidin-Meerrettich-Peroxidase und einer Mischung aus TMB/TMF-Farbsubstraten.

Bei der Verwendung von homogenen Reaktionsformaten werden Detektionssonden verwendet, die entweder gequenchte Fluoreszenzmarkierungen, interne Basensubstitutionen mit Doppelstrang-Komplex-aktivierbaren Fluoreszenzfarbstoffen oder endständige Energie-Donatoren oder -Akzeptoren (in Kombination mit

5 entsprechenden Energie-Donatoren oder -Akzeptoren an benachbarten Primer- oder -E-Sondenenden: Energy-Transfer-Komplexe) tragen. In diesen Fällen wird die Detektionssonde schon während der Nukleinsäure-Vermehrung zugegeben. Im Fall der gequenchten Fluoreszenzmarkierungen erfolgt eine Fluoreszenzaktivierung durch Dequenching nach Bindung der Detektions-Sonde an das entstehende Tripartite-Mini-

10 Amplikon und exonukleolytischer Abbau und Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten Nukleotids. Im Fall der internen Basensubstitutionen erfolgt die Erzeugung des Fluoreszenzsignals durch Ausbildung des Bindekomplexes zwischen Detektionssonde und dem sich bildenden Tripartite-Mini-Amplikon. Im Fall der Energie-Transfer-Komplexe erfolgt die Bildung eines Fluoreszenzsignals durch

15 benachbarte Anlagerung des markierten Primers und der markierten Sonde. Die Messung der resultierenden Fluoreszenzsignale erfolgt jeweils bevorzugt durch Real time-Messungen.

In einer besonderen Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Fluorescein und Rhodamin oder Derivate davon als Fluoreszenz- und Quencher-

20 Komponenten verwendet. In einer weiteren Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Ruthenium- oder Rhenium-Chelate und Quinone oder Derivate davon als Elektrochemilumineszenz- und Quencher-Komponenten verwendet. In einer weiteren besonderen Ausführungsform werden als interne Basensubstituenten der Detektorsonde Anthrachinon oder Derivate davon verwendet. In einer weiteren

25 Ausführungsform werden Cy-5 und Fluorescein oder Derivate davon als Energie-Transfer-Komponenten verwendet. In einer speziellen Ausführungsform werden Cyanin-Farbstoffe wie z. B. SYBR Green oder Acridin-Farbstoffe verwendet.

Besonders bevorzugt im Sinne dieses ersten Aspekts der Erfindung sind solche Ausführungsformen, bei denen mindestens eine der Bindesequenzen der Primer und der Sonde

30 nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist. Spezifisch im Sinne der

Erfindung ist eine Sequenz dann, wenn sie aufgrund einer fortlaufenden Sequenz von Nukleobasen prinzipiell in der Lage wäre, unter stringenten Bedingungen nur mit einer Sequenz auf der nachzuweisenden Nukleinsäure, nicht jedoch mit Nukleinsäuren anderer, nicht nachzuweisender Organismen oder Spezies oder Gruppen von

- 5 Organismen zu binden. Bevorzugt ist eine Sequenz dann nicht für eine Sequenz spezifisch, wenn sie unter den Bedingungen, welche für die Durchführung des Nachweises eingestellt werden, mit anderen Nukleinsäuren hybridisieren könnte.

- Unabhängig von dem bisher beschriebenen ersten Aspekt der Erfindung ist ein übergeordneter Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zum spezifischen Nachweis  
10 einer Nukleinsäure umfassend die Schritte Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer, Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Strang des Amplifikates und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die  
15 nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist. In diesem Fall kann der Bereich B Nukleotide enthalten, welche nicht der Bindesequenz E zugehören. Auch hier sind jedoch Überlappungen der Bindesequenzen der Primer und der Sonde möglich.

- Homologien zu anderen Genomen (Sequenzen) lassen sich mit Hilfe einer definierten Ausgangssequenz identifizieren. Verwendet wird eine z. B. über das Internet für jeden  
20 zugängliche Suchmaschine mit Namen "BLAST" (Basis Local Alignment Search Tool) (Homepage-Adresse: ><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/><).

Diese ermöglicht den Zugriff auf diverse andere Sequenz- und Proteindatenbanken, von denen als am wesentlichsten zu benennen sind:

GenBank, EMBL, DDJB, PDB, PIR und Swiss-Prot.

- 25 Es werden auch BLASTN-Verfahren gemäß Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 im Rahmen von UWGCG Suchverfahren verwendet.

Die Suchverfahren werden auch auf Sequenzdatenbanken wie z. B. die EMBL-Sequenzdatenbanken, bevorzugt auch virale Sequenzdatenbanken wie z. B. em-vrl angewandt.

Das Blast-Programm bietet dem Anwender zahlreiche Anpassungsmöglichkeiten, um eine individuelle Suche ausführen zu können, d. h. solche Sequenzen zu identifizieren, die für einen oder mehrere Analyten spezifisch sind, oder die eben nicht spezifisch sind, d. h. auch in anderen Organismen vorkommen oder nicht. Hierzu wird auch verwiesen

5 auf Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 403-410.

Erstaunlicherweise ergibt sich nämlich die Selektivität des Nachweisverfahrens nicht allein aus der Selektivität der einzelnen Primer für ein spezifisches Target, sondern aus der kumulierten Selektivität des Gesamtsystems. So können sogar zwei Primer oder

10 zwei Primer und eine Sonde, einzeln völlig unselektiv sein, d. h. einzeln mit einer Vielzahl von Targets hybridisieren; dadurch, daß sich die Selektivitäten der einzelnen Primer und Sonde (nur) in der nachzuweisenden Nukleinsäure überlagern, ist eine Gesamtspezifität gegeben. Dadurch, daß man auf die Selektivität der Primer aber bei der Auswahl der zu amplifizierenden und nachzuweisenden Nukleinsäure nicht so sehr fest-

15 gelegt ist, ist es viel besser möglich, für unterschiedliche Targets kurze Amplicons zu lokalisieren, die in ihrer Länge vollständig oder weitgehend (d. h. über 95 %) übereinstimmen. Dies macht Simultan-Amplifikationen und -Hybridisierungen (wie im Falle von Nukleinsäuresondenarrays) besser realisierbar und reproduzierbar.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses

20 Verfahrens. Dieses enthält die Primer und bevorzugt auch eine Nachweissonde. Es kann jedoch auch weitere Reagenzien, wie Puffer und Enzyme, z. B. eine Polymerase, enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform enthalten die Primer an ihrem 5'-Ende weitere Sequenzen. Diese Sequenzen sind zwischen 1 und 100, besonders bevorzugt zwischen 5

25 und 80 Nukleotide lang. Bislang war es nicht üblich, Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 40 nt als Primer zu wählen. In einer Ausführungsform werden diese Sequenzen so gewählt, daß sie gerade nicht mit den an die Primerbindungsstelle auf der nachzuweisenden, aber einer anderen, nicht nachzuweisenden, Nukleinsäure hybridisieren können. Es ist sogar möglich, diese so zu wählen, daß sie komplementär

30 zu den Sequenzen sind, die an die Bindungsstelle desselben Primers auf einer nicht

nachzuweisenden Nukleinsäure anschließen. Wenn also der Primer auch an ein humanes Genom binden kann, können die Sequenzen auch human sein. Es ist möglich, einen, aber auch beide der Primer entsprechend zu modifizieren. Die zusätzlichen Sequenzen sind nicht so lang, daß sie eine Hybridisierung der Primer mit den Bindefolgen auf der nachzuweisenden Nukleinsäure, z.B. dem HCV-Genom verhindern. Die  
5 zusätzlichen Sequenzen können auch so gewählt werden, daß sie fester mit kurzen Teilsequenzen der Primer in der Primerbindungsstelle hybridisieren, als diese mit anderen Sequenzen in der Primerbindungsstelle binden. So können Sekundärstrukturen innerhalb der Primer aufgelöst und die Bindefähigkeit der Primer mit der  
10 nachzuweisenden Nukleinsäure verbessert werden.

Eine weitere Möglichkeit, Primer und Sonden gezielt unselektiv zu machen, besteht in der Verwendung degenerierter Basen innerhalb der Sequenz. Dabei wird zweckmäßigerweise die Region, in der die Hybridisierung der Targetnukleinsäure mit dem Primer oder der Sonde stattfinden soll, so gewählt, daß relativ wenig Unterschiede  
15 zwischen der Targetsequenz und einer anderen, jedoch nicht nachzuweisenden Sequenz (z. B. eines anderen Mikroorganismus) bestehen. Die noch bestehenden Unterschiede können durch den Einsatz degenerierter Basen an den differierenden Basenpositionen weitgehend ausgeglichen werden. So lassen sich Unterschiede von Primern (A bzw. G) durch den Einbau der Base P (6H, 8H-3,4-dihydro-pyrimido[9,5-C][1,2]oxazin-7-on,  
20 z. B. Nucleic Acids Research, Vol. 17, 24, 1989, p. 10373-10383) ausgleichen. Dasselbe gilt für Pyrimidine mit der Base K (Nucleosides & Nucleotides, 16 (7-9), 1507-1511 (1997)). Eine noch stärkere Degenierung ist durch den Einsatz von Inosin möglich (US-A-5,585,477; US-A-5,691,134; US-A-5,578,467; J.Biol.Chem. 260, 5, 2605-2608, 1985; Nucl.Acids Res. 1995, 23, 13, 2499-2505), da Inosin Basenpaarung mit allen vier  
25 Basen erlaubt.

Eine weitere Möglichkeit, nichtkomplementäre Basen einzusetzen, ist der Ersatz von A durch D (Diaminopurine oder/und der Ersatz von C durch M (Methylcytosin).

In einer weiteren Ausführungsform sind das 5'-Ende des einen Primers und das 5'-Ende des anderen Primers miteinander kovalent verknüpft.

Hierbei sind zwei unterschiedliche Ausführungsformen denkbar. In einer ersten Ausführungsform sind der forward- und der reverse-Primer für die Amplifikation des gleichen Analyten miteinander verknüpft. Das Ergebnis der Amplifikation sind somit eine Vielzahl von Konstrukten, bei denen zwei unterschiedliche Amplifikatstränge  
5 miteinander kovalent verknüpft sind. Als Nebenprodukt, welches jedoch ebenfalls Grundlage des Nachweises sein kann, werden Produkte gebildet, bei denen nur einer der beiden Primer(teile) verlängert ist.

In einer zweiten Ausführungsform sind die beiden miteinander verknüpften Primer für die Amplifikation unterschiedlicher nachzuweisender Nukleinsäuren (z. B. einer für  
10 HBV, der andere für HGV) bestimmt. Zur Amplifikation müssen dann noch die entsprechenden reverse- bzw. forward-Primer zugesetzt werden. Dabei können die 5'-Enden der Primersequenzen direkt oder über einen Linker miteinander verknüpft sein. Als Linker kommt jede Art von Molekül in Frage, da es auf die Einhaltung eines bestimmten, auf den Abstand der Basen auf einer nachzuweisenden Nukleinsäure nicht  
15 ankommt. Der Linker ist jedoch bevorzugt nicht so hydrophob, daß die Löslichkeit des Konjugats zu sehr beeinträchtigt wird. Bevorzugt enthält der Linker einen oder mehrere Nukleotidsequenzen, die nicht direkt mit den korrespondierenden oder anderen Sequenzen auf der den nachzuweisenden Nukleinsäure(n) komplementär sind. Besonders bevorzugt ist mindestens eine der Sequenzen eine, welche die Bedingungen  
20 für die zusätzlichen Sequenzen der oben beschriebenen (monofunktionellen) Primer erfüllen.

Auch diese (bifunktionellen) Primerkonjugate eignen sich also für multiple (mindestens Duplex) Bestimmungen von Analytnukleinsäuren. Diese Konjugate können prinzipiell auf bekannte Weise hergestellt werden, wenngleich es bevorzugt ist, zunächst die noch  
25 geschützten Einzelsequenzen chemisch zu synthetisieren, dann eines der Enden der einen Einzelsequenz zu aktivieren und eines der Enden der anderen Einzelsequenz zu entschützen. Die Kopplungsreaktion kann durch die Aktivierungsgruppe relativ selbsttätig ablaufen oder durch Aktivierungsreagenzien beschleunigt werden.

Besonders bevorzugt wird das Konjugat aber durch durchgehende sequentielle Verlängerung an einer Festphase, ohne zwischenzeitliche Ablösung hiervon, chemisch synthetisiert. Dazu kann zunächst die erste Teilsequenz wie üblich mit 3'-Phosphoramiditen synthetisiert werden. Ab der Verknüpfungsstelle (5'-5'-Link) wird  
5 anstelle des 3'-Phosphoramidits ein 5'-Phosphoramidit eingesetzt. Dies führt zu einer Umkehr der Polarität innerhalb des Konjugats. Die Reaktionssequenz ist beispielhaft in FIG 5, die zugehörigen Reagenzien in FIG 6 gezeigt.

Bevorzugt binden die Primer an die Bindesequenzen A bzw C', wie oben beschrieben, und die Sonde an einen zwischen den Enden der Bindesequenzen A und C' gelegenen  
10 Bereich B oder das Komplement davon.

Auch wenn mindestens eine Sequenz aus den 3 Bindesequenzen der beiden Primer und der Sonde nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure ist, bleibt die Gesamtspezifität des Nachweisverfahrens erhalten. Ist eine der Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, sondern bindet auch an andere  
15 Nukleinsäuren, kann kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, da die zweite Primerbindungssequenz auf dieser Nukleinsäure fehlt. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte auf der anderen Nukleinsäure werden nicht detektiert, wenn die spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist auch die zweite Primersequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende  
20 Nukleinsäure, kann nur dann ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, wenn beide Primerbindungssequenzen in der gleichen Nukleinsäure-Vermehrungseinheit sind. Dieses Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt wird ebenfalls nicht detektiert, da die spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist die Sondensequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, jedoch die beiden Primer spezifisch, werden keine  
25 Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure gebildet. Ist zusätzlich zur Sondensequenz auch eine der beiden Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann wiederum kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet werden. Unspezifische  
30 Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure, die möglicherweise



- gebildet werden, enthalten andere Sequenzen im Sondenbindungsbereich und werden daher nicht detektiert. Sind alle drei Bindungssequenzen für die beiden Primer und die Sonde nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, wird kein Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt gebildet, wenn mindestens eine der beiden Primersequenzen nicht
- 5 in einer Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der anderen Nukleinsäure liegt. Liegt die Sondensequenz nicht in der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der beiden Primersequenzen für die andere Nukleinsäure, kann zwar ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet, aber nicht detektiert werden. Der einzige Fall, daß ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen
- 10 Nukleinsäure gebildet und detektiert werden kann, ist, wenn alle drei Sequenzen innerhalb eines Nukleinsäure-Vermehrungsbereichs liegen. Dies kann jedoch durch entsprechende Sequenzauswahl der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit vermieden werden, z. B. indem die Primerhybridisierungsstellen nicht gleichzeitig aus demselben Locus desselben nicht nachzuweisenden Organismus gewählt werden.
- 15 In einer weiteren Ausführungsform findet die Herstellung der Amplifikate unter Einsatz von Nukleotiden, besonders bevorzugt Mononukleotiden, welche jeweils zu A, G, C und/oder T komplementär sind, statt. Bevorzugt enthält der Bereich B bzw. B' der nachzuweisenden Nukleinsäure alle 4 natürlichen Nukleobasen.

- In einer weiteren Ausführungsform des neuartigen Verfahrens können Teilkomponenten
- 20 (Primer oder Sonden) der verschiedenen Primer-Sonden-Kombinationen für die verschiedenen nachzuweisenden Nukleinsäuren identisch sein. Hierdurch wird die Bestimmung mehrerer Nukleinsäuretargets, z. B. für unterschiedliche Viren wie HBV, HIV und HCV mit einer einzigen Amplifikationsreaktion möglich (Multiplex-Amplifikation). Ein technischer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß bei
- 25 Mehrfachbestimmungen einer Probe ein hoher Grad an Übereinstimmung der Meßwerte erreicht wird.

Im Folgenden sollen die beiden Aspekte der vorliegenden Erfindung anhand eines Nachweises für HCV beschrieben werden. Die Nukleinsäuresequenz von HCV ist beispielsweise in EP-B-0 318 216 beschrieben. Die Sequenzen der beteiligten

Komponenten sind in Figur 4 gezeigt. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den hochspezifischen und hochsensitiven Nachweis von Virus-Nukleinsäuren wie z. B. HCV-RNA aus der 5'-nichttranslatierten Region des HCV-Genoms in einer Kopienzahl von 10 Kopien pro Test mit einem dynamischen Bereich von  $10^5$ , bedingt durch ein  
5 verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis. Dies ist insofern überraschend, da bei dem Test Primer und Sonden einsetzbar sind, die ein für den Fachmann nicht bevorzugtes Primer/Sonden-Design aufweisen, nämlich z. B. Sequenzabschnitte, die zur Primer-Dimer-Bildung neigen, oder Basenfehlpaarungen nahe dem 3'-Ende. Die kurze Sonde hat einen Schmelzpunkt nahe der Testtemperatur, so daß der Fachmann keine stabile  
10 Bindung der Sonde an das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt erwartet hätte. Bei den bisherigen Tests mit den längeren, fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten wurde eine Spezifitäts- und Sensitivitätserhöhung bisher nicht über eine Verkürzung, sondern vielmehr eher über eine Verlängerung der Primer-Sonden-Sequenzen und/oder des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts mit den signalgebenden Komponenten  
15 versucht.

Der Nachweis von HCV-RNA ist überraschenderweise trotz der kurzen vermehrten Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure auch spezifisch und reproduzierbar in positiven HCV-Plasmaproben möglich, in denen die HCV-RNA nicht sequenzspezifisch vorgereinigt wurde, sondern direkt aus lysierten und über Glasoberflächen  
20 aufkonzentrierten Plasmaproben eingesetzt wurde. HCV-negative Plasmaproben ergeben kein Signal. Dies ist insofern überraschend, als das HCV-RNA-Genom sehr labil ist gegenüber Fragmentierung in Plasma-Lysaten. Mit z. B. HIV-Plasmaproben, HBV-Serumproben, Chlamydiaprobe aus Urin oder Human-DNA-Proben aus Vollblut, die ebenfalls über Glasoberflächen aufkonzentriert wurden, wird mit den eingesetzten  
25 Primern und Sonden ebenfalls kein Signal erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann verwendet werden, um einen oder mehrere der für den Stand der Technik geschilderten Nachteile zu vermeiden oder um einen oder mehrere der folgenden Vorteile zu realisieren. Die PCR-Zyklen können sehr viel kürzer sein. Die Gesamtzeit der Nachweisverfahren kann dadurch verkürzt werden. Die  
30 Sensitivität des Nachweises kann erhöht werden, da weniger Konkurrenz/Verdrängung

- zwischen dem kurzen Gegenstrang des Amplikons und der Detektorsonde stattfinden kann. Die Spezifität des Nachweises wird erhöht, da der relative Anteil der internen Detektorregion gegenüber der gesamten Amplikonlänge erhöht wird. Die Differenzierbarkeit von Subtypen kann erhöht werden. Der Nachweishintergrund kann gesenkt
- 5 werden, da kurze Amplika weniger Potential für unspezifische Hybridisierung mit sich bringen. Aus diesem Grund kann das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann erhöht werden, da kleinere Targetregionen auf RNA-Genomen weniger sensitiv für RNA-Abbau sind. Die Möglichkeiten zur Ausbildung von Sekundärstrukturen werden reduziert.
- 10 Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

## Allgemeines

Alle verwendeten Oligonukleotide sind linear und einzelsträngig.

## Beispiel 1

### Nachweis von HCV aus menschlichem Blut

5 a) Probenvorbereitung:

Die RNA-Isolierung aus Plasma erfolgte anhand folgenden Probenvorbereitungsprotokolls:

1. Plasma (420 µl) mit 80 µl Proteinase K (25 mg/ml) mischen und einige Sekunden vortexen
- 10 2. Zugabe von 500 µl Lysepuffer (inkl. 1 µg Carrier-RNA (polyA)/ml): 5,4 M Guanidinium-Thiocyanat; 10 mM Harnstoff; 10 mM Tris-HCl; 20 % Triton X 100; pH 4,4
3. vortexen und anschließend 10 min bei RT schütteln
4. Zugabe von 500 µl Isopropanol-MGP (6 mg magnetische Glaspartikel in Isopropanol)
- 15 5. vortexen und anschließend 20 min bei RT schütteln
6. Magnetseparation der MGPs
7. Überstand abnehmen und werfen
8. Zugabe von 750 µl Waschpuffer: 20 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 70 % Ethanol
- 20 9. MGPs auf Vortex resuspendieren und erneute Magnetseparation
10. Waschvorgang insgesamt 5mal wiederholen
11. Zugabe von 100 µl DEMC-Wasser zur Elution
12. 15 min bei 80 °C schütteln

13. Magnetseparation

14. 10 µl des Eluats in die RT-PCR einsetzen

b) Klonierung und Präparation des RNA-Standards:

5 Der Wildtypstandard "pHCV-wt" wurde zunächst durch Amplifikation eines Abschnitts des HCV-Genoms mit den Primern KY80 (5'-gcagaaagegtctagccatggcgt-3', SEQ.ID.NO.1) und KY78 (5'-ctcgcaagcacctatcaggcagt-3', SEQ.ID.NO.2) gewonnen und das Amplikon anschließend über eine sog. "blunt-end"-Klonierung in den Vektor pBluescript SK+ kloniert. Nach Vermehrung der bakteriellen Zellen wurde das Plasmid isoliert, durch restriktionsenzymatischen Verdau linearisiert  
10 und über eine in-vitro-Transkription das entsprechende RNA-Fragment gewonnen und aufgereinigt.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte über photometrische Messung der Absorption bei 260 nm.

15 Alle hier beschriebenen molekularbiologischen Verfahren können einschlägigen Methodik-Büchern entnommen werden (e.g. Maniatis et al.; Ausubel et al.).

## c) RT-PCR assay:

Die Amplifikation erfolgte mit den u.g. Reagentien und nach u.g. Cyclerprotokoll:

Reagentien	Endkonzentration im Mastermix
5 x RT-PCR-Puffer	1 x
MnOAc	2,5 mM
Tth-Polym.	10 u
dNTP-Mix	200 µM (dATP, dCTP, dGTP) / 600 µM (dUTP)
UNG	2u
Primer forw. HC2F	0.3 µM ( 5'-agtatgtgtgtcgtgcagcc-3', SEQ.ID.NO.3)
Primer rev. HC1F-bio	0.3 µM ( 5'bio--tggctctccccgggagtg-3', SEQ.ID.NO.4)

Die Amplifikation wurde nach folgendem Cyclerprotokoll durchgeführt:

10 min	37 °C	Dekontamination durch UNG
30 min	60 °C	reverse Transkription
1 min	95 °C	Denaturierung

Reagentien	Endkonzentration im Mastermix
35 Zyklen:	
15 sec	94 °C Denaturierung
20 sec	56 °C Primer-Annealing und Elongation
7 min	72 °C Elongation
hold	50 °C

## 5 d) Detektion:

Die gesamte Detektionreaktion erfolgte vollautomatisiert an einem Elecsys® 1010-Analyse-Automaten (Boehringer Mannheim GmbH). Kurzbeschreibung:

1. Entnahme von 10 µl Amplifikat und 35 µl Denaturierungslösung (BM-Id-No. 1469053)
2. Inkubation in einem Reaktionsgefäß für 5 min bei 37 °C

3. Zugabe von 130 µl Hybridisierungslösung BM-Id-No. 146 9045 versetzt mit 25 ng/ml Ruthenium-markierter Sonde
4. Inkubation für 30 min bei 37 °C
5. Zugabe von 35 µl einer Elecsys® SA Magnetbeadlg. (BM-Id-No. 171 9556)
- 5 6. Inkubation für 10 min bei 37 °C
7. Messung der Elektrochemilumineszenz von 120 µl des Reaktionsgemisches in der Elecsys® 1010-Meßzelle

Zur Hybridisierung wurden zwei unterschiedliche Ruthenium-gelabelte Sonden verwendet:

- 10                      PNA-Sonde:    Ru-(Ser)<sub>2</sub>-TCCAGGACCC-Ser-Gly
- DNA-Sonde:    5'-Ru-CTCCAGGACCCC-3', SEQ.ID.NO.5

**Beispiel 2****Ermittlung der analytischen Sensitivität anhand einer RNA-Standard-Verdünnungsreihe**

Amplifiziert wurden in Doppelbestimmungen  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  Kopien HCV-RNA-Standard. Als Kontrollen dienten ein HCV-negatives Plasma, ein HCV-positives Plasma (nach Probenvorbereitung) und Wasser. Nach Amplifikation wurden alle Proben gemessen (ECL-Detektion, Elecsys® 1010).

Ergebnis (Einheiten x 100):

Template	PNA-Sonde		DNA-Sonde	
	1.Best	2.Best.	1.Best	2.Best.
RNA-Std. $10^5$ Kopien	30608	30186	16791	15772
RNA-Std. $10^4$ Kopien	17895	15737	8977	7718
RNA-Std. $10^3$ Kopien	4137	4345	1911	1931
RNA-Std. $10^2$ Kopien	280	163	146	86
RNA-Std. $10^1$ Kopien	95	76	47	37
HCV-positives Plasma	26658	26262	14996	14552
HCV-negatives Plasma	93	98	49	48
Wasser	61	45	19	15

- 10 • Die Verwendung der Primer HC2F/HC1F-bio führt zu einer sehr guten Amplifikation in der RT-PCR, gemessen an dem Signalniveau: Hierbei wird der gesamte Detektionsbereich des Elecsys® ausgenutzt (ca. 5 log-Stufen).
- Es erfolgt eine sehr gute Signalabstufung innerhalb der Verdünnungsreihe
- Der Background, gemessen an HCV-negativem Plasma und Wasser, ist relativ gering
- 15 • Es ist sowohl die Verwendung von PNA als auch DNA als Sonde möglich



### Beispiel 3

#### Überprüfung der HCV-Assay-Spezifität

Hierzu wurden unterschiedliche Ausgangsnukleinsäuren (human-genomische DNA; HIV-RNA, HBV-DNA, Chlamydia-DNA) mit den o.g. Primern und Sonden getestet.

- 5 Als Positiv-Kontrolle diente HCV-Plasma und als Negativ-Kontrolle HCV-Negativ-Plasma sowie Wasser.

Ergebnis (Einheiten x 100):

Template	PNA-Sonde		DNA-Sonde	
	1.Best	2.Best.	1.Best	2.Best.
Human-genomische DNA aus Vollblut	52	45	41	56
HIV-positives Plasma	43	60	39	33
HBV-positives Plasma	53	40	25	27
Chlamydia-positiver Urin	43	34	19	17
HCV-positives Plasma	11543	10644	6900	6348
HCV-negatives Plasma	65	67	45	40
Wasser	29	25	15	15

- 10 • Beide verwendeten Sonden (PNA, DNA) ergeben nur mit ihrem zugehörigen Analyten ein Signal in der ECL-Messung. Das bedeutet: Keine detektierbaren unspezifischen Amplifikationen mit den verwendeten Primern und Sonden.

**Beispiel 4****Überprüfung der Sonden-Spezifität**

Für dieses Experiment wurden unterschiedliche Amplifikate anderer Analyten mit den jeweiligen spezifischen Primern hergestellt und dann gegen die o.g. PNA- und DNA-Sonden hybridisiert. Die Kontrolle der erfolgten Amplifikationen erfolgte mit der jeweiligen zugehörigen Analyt-Sonde.

Ergebnis (Einheiten x 100): (jeweils Mittelwert aus Doppelbestimmung)

Template	PNA-Sonde für HCV	DNA-Sonde für HCV	HIV-Sonde	HBV- Sonde	Chlamydia- Sonde
HIV	13	6	11908	nd	nd
HBV	13	13	nd	1384	nd
Chlamydia	10	10	nd	nd	3842
HCV	10132	9345	nd	nd	nd
Wasser	13	9	nd	nd	nd

- Die Kontrollreaktionen (HIV, HBV, Chlamydia) ergeben den deutlichen Nachweis von Amplifikat mit der entsprechenden Sonde.
- Die verwendeten PNA- sowie DNA-Sonden ergeben nur mit HCV ein spezifisches Signal.
- Es treten keine unspezifischen Hybridisierungen der PNA/DNA-Sonden mit anderen Amplifikaten auf.

## Beispiel 5

### Synthese eines 5'-5'-verknüpften Oligonukleotids (3'-(Primer-1)-5'-5'-(Primer-2)-3')

5

Die Synthese des 5'-5'-verknüpften Oligonukleotids erfolgt an einem DNA Synthesizer Modell 394A der Fa. Applied Biosystems mit dem von Applied Biosystems empfohlenen Standard 1 µmol Synthesecyclus. Es wird eine Synthesesäule, die 1 µmol eines mit dem entsprechenden 5'-O-DMT geschützten Startnukleosid funktionalisierten Trägermaterials (1) (erhältlich von der Fa. Applied Biosystems) enthält sowie 5'-O-DMT-3'-Phosphoramidite (2) (erhältlich von der Fa. Applied Biosystems) für die Primer-1-Sequenz und 3'-O-DMT-5'-Phosphoramidite (3) (erhältlich von der Fa. Eurogentec/Glen Research) für die Primer-2-Sequenz verwendet. Der Synthesizer wird mit im ABI Manual empfohlenen Synthesereagenzien (bottle #1-4 = 5'-O-DMT-3'-Phosphoramidite 2 (0,1 M in MeCN), #5-8 = 3'-O-DMT-5'-Phosphoramidite 3 (0,1 M in MeCN), #9 Aktivator: Tetrazol (0,5 M in MeCN), #10 konz. Ammoniak p.A., #11 Cap A: Ac<sub>2</sub>O/Pyridin/THF, #12 Cap B: N-Methylimidazol/THF, #14, TCA in DCM (2%), #15 Oxidationsreagenz: I<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O/Pyridin/THF, #18 MeCN, #19 DCM) (alle erhältlich von der Fa. Applied Biosystems) bestückt. Der Verlauf der Synthese wird über regelmäßige Tritylwert-Bestimmungen am Synthesizer (Autoanalysis) detektiert. Nach abgeschlossenem Synthesecyclus schließt sich die automatische Trägerabspaltung mit konz. Ammoniak an. Die Abspatlösung wird in ein spezielles Abspaltgefäß am Synthesizer geleitet. Diese wird dann noch 5 h im Wasserbad bei 56°C erwärmt, um alle Schutzgruppen abzuspalten. Nach Abkühlen wird die Lösung am Rotationsverdampfer einrotiert. Reinigung des Oligonukleotids erfolgt durch präparative Anionenaustausch-HPLC an einer Protein-Pak DEAE 8 HR 10 x 100 mm Säule (Waters) mit 25 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0-0.6 M NaCl, pH 8,5 als Elutionspuffer. Die Analytik erfolgt über eine Gen-Pak FAX 1,6 x 100 mm Anionenaustauscher-HPLC-Säule der Fa. Waters. Die Produktfraktionen werden durch Dialyse (MWCO 1000 der Fa. Spectrapore) entsalzt. Die entsalzte Oligonukleotid-Lösung wird einrotiert, in

sterilem Wasser gelöst, durch einen sterilen 0,2 µm Filter filtriert und die Konzentration durch UV-Spektroskopie bei 260 nm bestimmt. Ausbeute: 75 OD

## 5 Beispiel 6: Alternative Primer und Sonden Kombinationen

Alternativ können Primer und Sonden aus folgenden Primer- und Sonden-Regionen verwendet werden:

- 10 Forward Primer: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 390 und 417,  
reverse Primer: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 421 und 448,  
Sonde: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 391 und 440, alle bezogen  
auf die HGBV-B Sequenz aus der Sequenz HG22304 erhältlich aus der EMBL-  
Datenbank em-vrl, oder aus Proc. Natl. Acad. Sci USA 1995, 92, 3401-3405 und/oder  
15 aus J. Virol. 69: 5621-5630. Die in Figur 7 gezeigte Sequenz entspricht den Positionen  
390 bis 448 dieser Sequenz, so daß die Primer- und Sondenpositionen direkt  
umrechenbar sind.

Bevorzugte Primer-/Sonden-Kombinationen ergeben sich folgendermaßen:

- forward-Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 390-406, 390-408, 391-406, 391-  
20 408, 392-406, und 392-408,  
reverse Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 427-448, 427-447, 427-446, 428-  
448, 428-447, 428-446, 429-448 und 429-447,  
Sonde ausgewählt aus einer der Sequenzen: 402-412, 401-413, 400-414, 399-415, 398-  
415, 397-415, 396-415, 395-415, 394-415, 393-415, 392-415, 391-415, 408-436,  
25 408-435, 408-434, 408-433, 408-432, 408-431, 408-430, 408-429, 408-428, 409-  
436, 409-435, 409-434, 409-433, 409-432, 409-431, 409-430, 409-429, 409-428,  
410-436, 410-435, 410-434, 410-433, 410-432, 410-431, 410-430, 410-429, und  
410-428, oder, bevorzugt:

- forward-Primer: Sequenz von 390-406, 390-408, 391-406, 391-408, 392-406, und 392-  
30 408,

reverse Primer: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 423-448, 423-447, 423-446, 423-445, 423-444,

Sonde: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 402-412, 401-413, 400-414, 399-415, 398-415, 397-415, 396-415, 395-415, 394-415, 393-415, 392-415, 391-415, 409-433,  
5 409-432, 409-431, 410-433, 410-432, , 410-431, 410-430, 410-429, 410-428, 409-430, 409-429, 409-428, 408-433, 408-432, 408-431, 408-430, 408-429, und 408-428 oder, besonders bevorzugt:

forward Primer: Sequenz von 390-406, 391-406, und 392-406,

reverse Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 423-448, 423-447, 423-446, 423-445, 423-444,  
10

Sonde: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 402-412, 401-413, 400-414, 399-415, 398-415, 398-415, 397-415, 396-415, 395-415, 394-415, 393-415, 392-415, 391-415, 409-433, 409-432, 409-431, 410-433, 410-432, , 410-431, 410-430, 410-429, 410-428, 409-430, 409-429, 409-428, 408-433, 408-432, 408-431, 408-430, 408-429, und  
15 408-428.

Alle diese Sequenzen sind dem HGBV-B Genom entnommen und hybridisieren daher nicht selektiv mit HCV.

## 20 **Beispiel 7:**

### **Nachweis von HIV**

Als Ausgangsmaterial diente ein HIV-positives Plasma mit einer Ausgangskonzentration von 15000 Genomäquivalente (geq) HIV pro ml. Dieses Plasma wurde sukzessive  
25 um den Faktor 10 in negativem Plasma verdünnt und nach Probenvorbereitung jeweils in Doppelbestimmungen mit den entsprechenden Primerpaaren amplifiziert. Als Kontrollen dienten ein HIV-negatives Plasma und Wasser. Zur Bestimmung der Spezifität wurde zusätzlich ein HBV- und ein HCV-positives Plasma mitprozessiert.  
30 Nach Amplifikation wurden alle Proben gemessen (ECL-Detektion, Elecsys® 1010).

Verwendete Primer und Probes:

primer	sequence	position	amplicon
SK 462 SK 431 (gag) SK 102	5'-AGTTGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT-3' 5'-TGCTATGTCAGTTCCCCTTGGTTCTCT-3' 5'-ATCAATGAGGAAGCTGCAGA-3'	1359-1388 (30) 1474-1500 (27) 1402-1421 (20)	142 bp
RAR 1032 RAR 1033 (pol) RAR 1034	5'-GAGACACCAGGAATTAGATATCAGTACAATGT-3' 5'-CTAAATCAGATCCTACATATAAGTCATCCATGT-3' 5'-CCACAAGGATGGAAAGGATCACCAGCTATATTCCA-3'	2961-2992 (32) 3097-3129 (33) 2997-3031 (35)	169 bp
GH A1F GH A1R (pol) GH A1P	5'-TGTACCAGTAAAATTAAAGCCAG 5'-GGCCATTGTTTAACTTTTGG 5'-AGGAATGGATGGC	2570-2592 (23) 2604-2623 (20) 2591-2603 (13)	54 bp
GH A2F GH A2R (pol) GH A2P	5'-TACCTGGCATGGGTACCAGC 5'-GACTAATTTATCTACTTGTTCATTTTC 5'-CACACAAAGGAATTGGAG	4143-4162 (20) 4180-4205 (26) 4162-4179 (18)	63 bp
GH A3F GH A3R (pol) GH A3P	5'-TTTGGAATTCCTACAATCC 5'-AATTCCTTATTCATAGATTCTACTAC 5'-CCCAAAGTCAAGGAG	4644-4663 (20) 4677-4702 (26) 4663-4677 (15)	59 bp
GH A4F GH A4R (pol) GH A4P	5'-TCAAAATTTTCGGGTTTATTACAG 5'-AGCTTTGCTGGTCCTTTCCTCA 5'-GGACAGCAGAAATCCACTT	4889-4912 (24) 4932-4951 (20) 4913-4931 (19)	63 bp
GH A5F GH A5R (pol) GH A5P	5'-GGAAAAGGTCTATCTGGCATGGGT 5'-ACTAATTTATCTACTTGTTCATTTCTCCTC 5'-ACCAGCACACAAAGGAATTG	4133-4156 (24) 4177-4204 (28) 4157-4176 (20)	72 bp
GH A6F GH A6R (pol) GH A6P	5'-GCAACTAGATTGTACACATTTAGAAG 5'-CTTCTATATATCCACTGGCTACATG 5'-GAAAAGTTATCCTGGTAGCAGTT	4412-4437 (26) 4461-4485 (25) 4438-4460 (23)	74 bp

5

Anm.: SK und RAR sind jeweils publizierte Roche Primer/Probes, GH-A1 bis GH-A6  
neue MCR Primer aus der pol-Region des HIV-Genoms

- 53 -

Amplifikationsmix und Thermocycler-Protokoll

Mastermix:

Reagentien	Endkonz. in mastermix
5x bicine-buffer	1x
MnOAc	2,5 mM
dNTPs (incl. dUTP)	200µM/600µM
forward primer	0,3 µM
reverse primer (biotinylated)	0,3 µM
Tth-polymerase	10 units
UNG	2 units

5

Gesamtvolumen: 100 µl

## PCR-Cycling:

	10 min 37°C	UNG Dekontaminierung
	30 min 60°C	Reverse Transcription
	30 sec 95°C	Denaturierung
5 Zyklen	15 sec 95°C	Denaturierung
	20 sec 50°C	Annealing Elongation
30 Zyklen	15 sec 94°C	Denaturierung
	20 sec 60°C	Annealing Elongation
	7 min 72°C	Elongation
	50°C	

10

*Ergebnis (ECL-counts x 100):*

Template	SK-primer	RAR-primer	GH-A2	GH-A3	GH-A4	GH-A6
HIV 15000 Kopien/ml	5763	294	5786	4209	7981	6809
HIV 1500 Kopien/ml	626	38	724	466	899	999
HIV 150 Kopien/ml	184	14	86	164	117	122
HIV 15 Kopien/ml	58	9	13	27	25	10
HIV 1.5 Kopien/ml	49	9	14	32	14	10
HIV-negatives Plasma	70	9	22	38	16	11
HCV-positives Plasma	49	9	5	58	16	10
HBV-positives Plasma	37	9	5	81	17	10
Wasser	12	9	16	35	15	10

- Es erfolgt eine sehr gute Signalabstufung innerhalb der Verdünnungsreihe

**Beispiel 8:****Nachweis von HBV**

- 5 Amplifiziert wurden in Doppelbestimmungen  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  Genomäquivalente (geq) HBV. Als Kontrollen dienten ein HBV-negatives Plasma und Wasser. Nach Amplifikation wurden alle Proben gemessen (ECL-Detektion, Elecsys® 1010).

Probenvorbereitung von HBV-positivem Plasma erfolgte analog der für HCV

- 10 beschriebenen Probenvorbereitung.

Verwendete Primer und Probes:

	Primer/Sonde	Sequenz	Position	Ampliconlänge
Ref	HBV-Forward HBV-Reverse Capture probe	5'-GGAGTGTGGATTCGCACT-3' 5'-TGAGATCTTCTGCGACGC-3' 5'-AGACCACCAAATGCCCCTAT-3'	2267-2284 (18) 2419-2436 (18) 2297-2316 (20)	170 bp
1	GHBV-1F GHBV-1R Capture probe 1P	5'-CCACCAAATGCCCCTAT-3' 5'-CCCGTCGTCTAACAACAG-3' 5'- CTTATCAACACTTCCGGAAACTA-3'	2300-2316 (17) 2340-2357 (18) 2317-2339 (23)	58 bp
2	GHBV-2F GHBV-2R Capture probe 2P	5'-GCGGGGTTTTTCTTGTT-3' 5'-TCTAGACTCTGCGGTATTGTG-3' 5'-TTGACAAGAATCCTCA-3'	203-219 (17) 232-252 (21) 218-233 (16)	50 bp
3	GHBV-3F GHBV-3R Capture probe 3P	5'-GATCCCCAACCTCCAATC-3' 5'-CAGCGATAACCAGGACAAAT-3' 5'- ACTCACCAACCTCCTGTCCTCCA-3'	315-332 (18) 356-375 (20) 333-355 (23)	61 bp
4	GHBV-4F GHBV-4R Capture probe 4P	5'-ACTTCTTTTCCTTCGGTCAGA-3' 5'-AAGGCTTCCCGATACAGAG-3' 5'-GATCTCCTAGACACCGCCTCGG- 3'	1965-1984 (20) 2007-2015 (19) 1985-2006 (22)	61 bp
5	GHBV-5F GHBV-5R Capture probe 5P	5'-CAGCCAACCAGGTAGGAGTG-3' 5'-CCGTGTGGAGGGGTGAAC-3' 5'-GGAGCATTCGGGCCAGG-3'	3014-3033 (20) 3051-3068 (18) 3034-3050 (17)	55 bp

- 15 Anm: Ref. sind Referenz-Primer. Nummer 1-5 die neuen MCR-HBV-Primer.



Amplifikationsmix und Thermocycler-Protokoll

## Mastermix:

5

Reagentien	Endkonz. in mastermix
10x PCR buffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
dNTPs (incl. dUTP)	200µM/600µM
forward primer	0,3 µM
reverse primer (biotinylated)	0,3 µM
Taq-polymerase	2,5 units
UNG	2 units

Gesamtvolumen: 100 µl

## PCR-Cycling:

10

	10 min 37°C	UNG Dekontaminierung
	10 sec 95°C	Denaturierung
5 Zyklen	10 sec 55°C	Annealing
	10 sec 72°C	Elongation
	10 sec 90°C	Denaturierung
30 Zyklen	10 sec 60°C	Annealing
	10 sec 72°C	Elongation
	50°C	

Die Detektion erfolgte ebenfalls analog zu der für HCV beschriebenen Detektion.

*Ergebnis (ECL-counts x 100):*

Template	Referenz	GHBV-1	GHBV-2	GHBV-3	GHBV-5
HBV 10 <sup>5</sup> Kopien/ml	3115	11079	37008	27190	37132
HBV 10 <sup>4</sup> Kopien/ml	2758	4849	10469	18181	9408
HBV 10 <sup>3</sup> Kopien/ml	1643	2433	2035	7166	2988
HBV 10 <sup>2</sup> Kopien/ml	226	357	302	235	493
HBV 10 <sup>1</sup> Kopien/ml	119	6	13	54	13
HBV 10 <sup>0</sup> Kopien/ml	14	11	13	146	13
HBV-negatives Plasma	15	12	11	85	14
Wasser	15	11	15	44	11

- Die Signale der MCR-Primer zeigen eine deutlich verbesserte Dynamik im Vergleich zur Referenz
- 5
- Es erfolgt eine sehr gute Signalabstufung innerhalb der Verdünnungsreihe
  - Der Background, gemessen an HBV-negativem Plasma und Wasser ist relativ gering

- 57 -

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH

5 (B) STRASSE: Sandhoferstr. 116

(C) ORT: Mannheim

(E) LAND: DE

(F) POSTLEITZAHL: 68305

(G) TELEFON: 0621 759 4348

10 (H) TELEFAX: 0621 759 4457

## (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Spezifisches und sensitives Nukleinsäurenachweisverfahren

## (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

15 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCAGAAAGCG TCTAGCCATG GCGT

24

30

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

5 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

10

CTCGCAAGCA CCCTATCAGG CAGT

24

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

20 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AGTTATGTGT GTCGTGCAGC C

21

## 25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

30 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGGCTCTCCC GGGAGTGG

18

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

10 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

15 CTCCAGGACC CC

12

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
  - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann,
  - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und
  - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer oder beiden Bindesequenzen der Primer überlappt.
3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer an seinem nicht verlängerbaren Teil Nukleotide aufweist, die nicht direkt mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement hybridisieren.
4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge der Bindesequenzen von dem von der Bindesequenz der

Sonde wegweisenden Teil der Bindesequenz des einen Primers bis zu dem ebenfalls von der Bindesequenz der Probe wegweisenden Teil des anderen Primers kleiner ist als 100 Nukleotide.

- 5 6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer immobilisierbar und die Sonde nachweisbar markiert ist.
7. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nachweisbar und die Sonde immobilisierbar markiert oder immobilisiert ist.
- 10 8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.
9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Primer durch eine erste Energietransferkomponente und die Sonde  
15 durch eine zweite, davon verschiedene Energietransferkomponente markiert ist.
10. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikat durch physikalische und/oder spektroskopische Methoden detektiert wird.
11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
20 daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß  
25 die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.

14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.
15. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
- 5       - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz A der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C komplementär ist, binden kann, und Nachweis der Amplifikate
- 10       mittels Massenspektroskopie.
16. Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
- Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer,
- Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat
- 15       binden kann, und
- Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer
- 20       nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt
- 25       werden.



20. Verfahren zur gleichzeitigen Herstellung von Amplifikaten von Teilen von Nukleinsäuren, bei dem Primer eingesetzt werden, die eine Amplifikation dieser Teile mit den unterschiedlichen Sequenzen erlauben, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer so ausgewählt werden, daß die gebildeten Amplifikate in ihrer Länge um nicht mehr als 20 % unterscheiden und nicht länger als 100 Nukleotide sind.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß gleichzeitig Amplifikate von Nukleinsäuren von HIV, HBV und HCV hergestellt werden.
22. Verfahren zum Nachweis von HCV, dadurch gekennzeichnet, daß Primer und Sonden verwendet werden, deren Sequenzen aus Sequenzen von fortlaufenden Basen der HGBV-Sequenzen aus Fig. 7 hierzu komplementären Sequenzen oder Sequenzen mit mehr als 80% Identität zu diesen Sequenzen entnommen sind.



Fig. 1

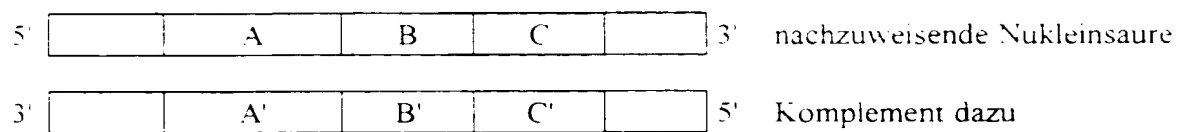


Fig. 2

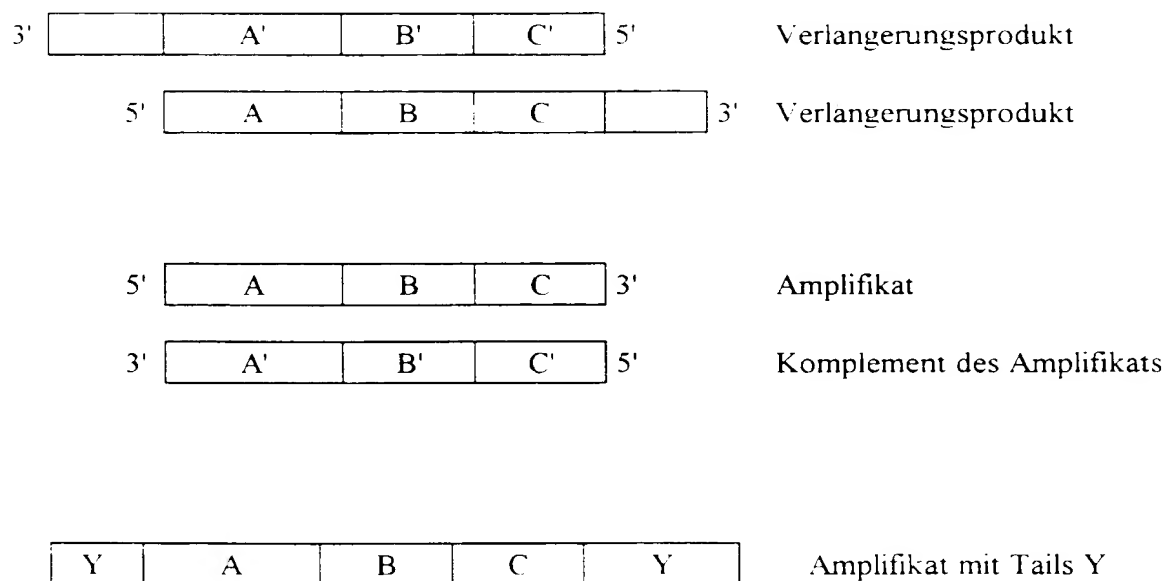




Fig. 3

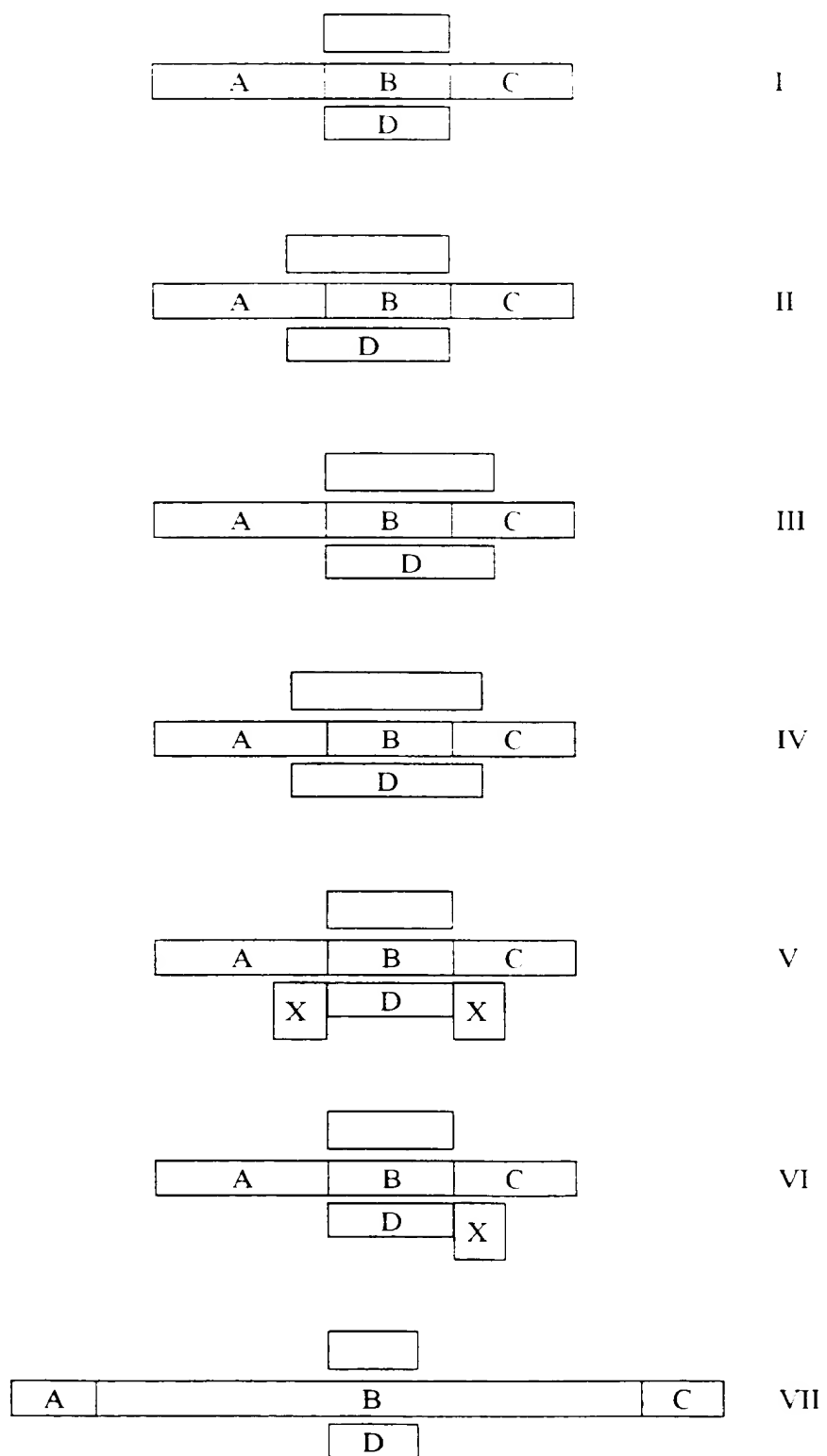




Fig. 4

HCV        AGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCA  
HUMAN     AGTATGIGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCACTCCCGGGAGAGCCA

Fig. 7

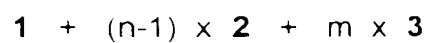
HCV  
5'-GTACTGCCTG ATAGGGTGCT TGCGAGTGCC CCGGGAGGTC TCGTAGACCG  
TGCACCATG-3'

HGBV-B  
5'- GTACTGCCTG ATAGGGTCCT TGCGAGGGGA TCTGGGAGTC TCGTAGACCG  
TAGCACATG-3'





FIG 5



1. n+m Synthesecyclen  
2. konz. Ammoniak

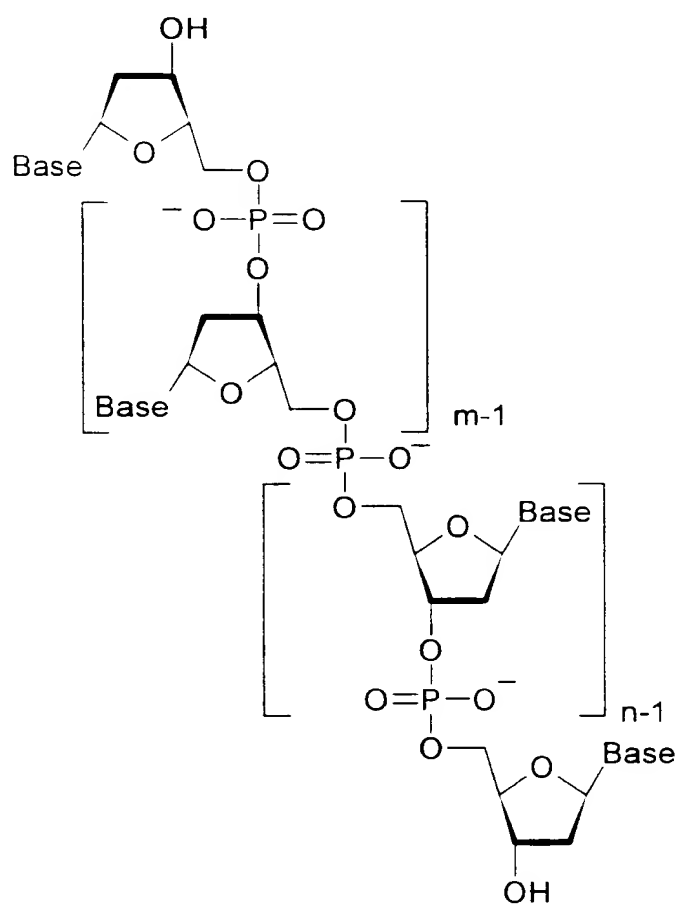




FIG 6

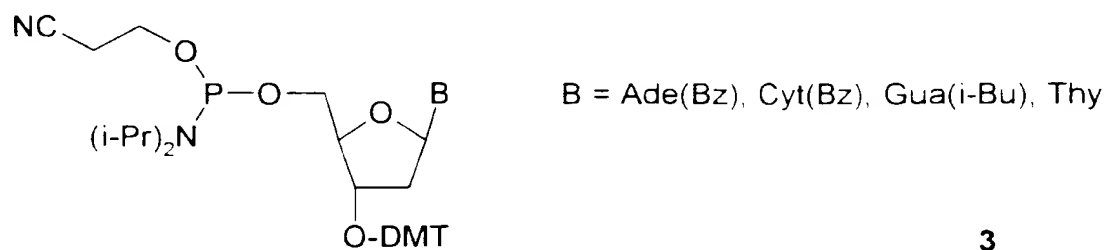
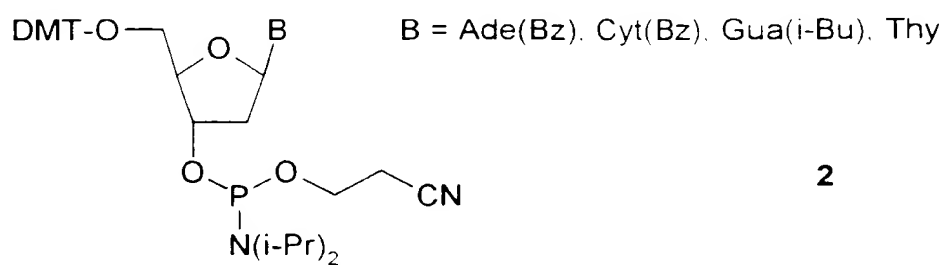
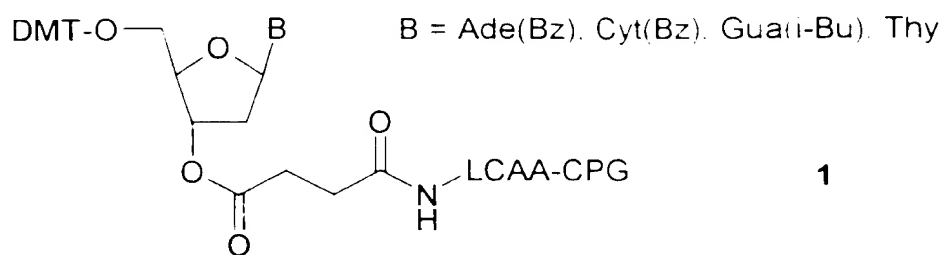




FIG 8

HCV_MCR01	AGTATGTGTGTCGTGCAGCC	
MPF1		CCAGGACCCCCACTCCCGG
MPF1+1		TCCAGGACCCCCACTCCCGG
MPF2		CCAGGACCCCCACTCC
HCV_1A	AGTATGAGTGTGTCGAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGAGAGCCA	
HCV_1B	AGTATGAGTGTGTCGAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGAGAGCCA	
HCV_2B	AGTATGAGTGTGTCGAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGAGAGCCA	
HCV_MCR	AGTATGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCACTCCCGGAGAGCCA	
MPR1_rev&compl	GTGTGTGTCGAGCCTCCAGGA	
MPR2_rev&compl	TCGTGCAGCCTCCAGGA	
HCV_MCR02_rev&compl		CCACTCCCCGGGAGAGCCA

-----

#1



FIG 9

HCV		261	5'-CGTACTGCTGATAGGTCCTTCCGAGTCCCGGAGGTCCTCTAGACCGTGCCACCATCA-3'	333
Forward primer CK10/Reverse primer CK20				
Forward primer CK11/Reverse primer CK20		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-CAGAGATMTGCHATCGTGTAG-5'
		5'-CGTACTGCTGATAGGTC-3'		3'-CAGAGATMTGCHATGCTGTAG-5'
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK20-1		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-CGGDIIMDTMTGCHATGCTGTAG-5'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK20-1		5'-CGTACTGCTGATAGGTC-3'		3'-CGGDIIMDTMTGCHATGCTGTAG-5'
Forward primer CK10-2/Reverse primer CK20-2		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-MDGDIIMDTMTGCHAPPKPGTAG-5'
Forward primer CK11-2/Reverse primer CK20-2		5'-CGTACTGCTGATAGGTC-3'		3'-MDGDIIMDTMTGCHAPPKPGTAG-5'
Forward primer CK10/Reverse primer CK21				
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK21-1		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-CCTCAGACCATCTGCCATCGTGTACG-5'
		5'-CGTACTGCTGATAGGTC-3'		3'-CCTCAGACCATCTGCCATCGTGTACG-5'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK21-1		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-CCTCAGACCATCTGCCATCGTGTACG-5'
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK21-2		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-CCTCAGACCATCTGCCATCGTGTACG-5'
		5'-CGTACTGCTGATAGGTC-3'		3'-CCTCAGACCATCTGCCATCGTGTACG-5'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK21-2		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-CCTCAGACCATCTGCCATCGTGTACG-5'
Forward primer CK10-2/Reverse primer CK21-3		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-MTFPGGDIIMDTMTGCHAPPKPGTAG-5'
		5'-CGTACTGCTGATAGGTC-3'		3'-MTFPGGDIIMDTMTGCHAPPKPGTAG-5'
Forward primer CK11-2/Reverse primer CK21-3		5'-CGTACTGCTGATAGGTCCT-3'		3'-MTFPGGDIIMDTMTGCHAPPKPGTAG-5'
		5'-CGTACTGCTGATAGGTC-3'		3'-MTFPGGDIIMDTMTGCHAPPKPGTAG-5'
		389	5'-CGTACTGCTGATAGGTCCTTCCGAGGAGGTCCTCTAGACCGTGCCACCATCC-3'	449
HCV-B				





FIG 10

[illegible]



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68</b>		<b>A3</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/23249</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Mai 1999 (14.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT EP98 06952		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1998 (03.11.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 48 690.8 4. November 1997 (04.11.97) DE 198 14 001.0 28. März 1998 (28.03.98) DE 198 14 828.3 2. April 1998 (02.04.98) DE		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 10. September 1999 (10.09.99)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schlossbergweg 11, D-82057 Icking (DE). HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). BARTL, Knut [DE/DE]; Am Westend 6, D-82407 Wielenbach (DE). ORUM, Henrik [DK/DK]; Vildrosevej 3, DK-3500 Vaerlose (DK).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			
(54) Title: SPECIFIC AND SENSITIVE METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACIDS			
(56) Bezeichnung: SPEZIFISCHES UND EMPFINDLICHES NUKLEINSÄURENACHWEISVERFAHREN			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for detecting a nucleic acid comprising the production of a plurality of amplifications of a section of said nucleic acid with the assistance of two primers of which one can bond on a bonding sequence A of the nucleic acid and the other can bond on a bonding sequence C' which is complimentary to a sequence C. Sequence C does not overlap A and is situated in a 3' direction from A. The inventive method also includes bringing the amplifications in contact with a probe having a bonding sequence D which can bond on a sequence B, said sequence B being situated between sequences A and C, or the complement thereof. In addition, the invention relates to the detection of the construction of a hybrid out of the amplification and the probe, whereby the sequence situated between the bonding sequences A and C contains no nucleotides, said nucleotides not being linked to the bonding sequence D of the probe or to complement D' thereof.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz A der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C komplementär ist, binden kann. Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an eine zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde, wobei die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht der Bindesequenz D der Sonde oder ihrem Komplement D' zugehören.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/06952

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched: classification system followed by classification symbols

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 10675 A (STICHTING RES FONDS PATHOLOGIE) 25 July 1991 (1991-07-25)	1-4, 10-12, 14,16, 17,19
Y	page 4, line 8 - page 5, line 17 page 8, line 14 - page 9, line 16 page 12, line 13 - page 13, line 7 page 14 - page 20, line 28 ---	8,9
Y	US 5 538 848 A (LIVAK KENNETH J ET AL) 23 July 1996 (1996-07-23) the whole document ---	8
Y	EP 0 070 685 A (STANDARD OIL CO) 26 January 1983 (1983-01-26) abstract: figure 2 ---	9
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

### Special categories of cited documents

A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E' earlier document but published on or after the international filing date

L' document which may throw doubts on priority claims, or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason, as specified

O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

12 July 1999

27/07/1999

Name and mailing address of the SA

Authorized officer

European Patent Office, P.O. Box 1, Patentaan 1  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. +31-70 340-2040, Telex 51111 Eppo Nl  
Fax +31-70 340-3016

Reuter, U

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/06952

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No
X	US 5 527 898 A (BAUER HEIDI M ET AL) 18 June 1996 (1996-06-18)  column 8, line 22 - column 9, line 5 column 10, line 26 - column 11, line 30 column 17, line 48 - column 18, line 61; examples 1,3  ---	1,4,6,7, 10-14, 16-19
X	WO 96 29431 A (SEQUENOM INC) 26 September 1996 (1996-09-26) page 41, line 15 - page 44, line 22; figures 5.21; example 5 page 15, line 18 - page 16, line 4  ---	15
A	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22 July 1987 (1987-07-22) example 2  ---	5
X	CHELLY J ET AL: "Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glia cells." NATURE, (1990 MAR 1) 344 (6261) 64-5. . XP002108801 figure 1  ---	20
X	EP 0 593 789 A (SUMITOMO METAL IND) 27 April 1994 (1994-04-27) page 4, line 50 - page 6, line 40  ---	20
X	WO 92 19743 A (CHIRON CORP) 12 November 1992 (1992-11-12) page 43 page 140  ---	22
A	WO 96 35437 A (IMMUNO AG :EIBL JOHANN (AT); SCHWARZ OTTO (AT); DORNER FRIEDRICH ( ) 14 November 1996 (1996-11-14) page 12, paragraph 4 page 21, paragraph 2; example 6 page 30, paragraph 2; table 1.1 page 33-34  -----	20,21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/06952

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family members	Publication date
WO 9110675	A	25-07-1991	NL 9000134 A	16-08-1991
			AT 137809 T	15-05-1996
			AU 645286 B	13-01-1994
			AU 7071691 A	05-08-1991
			CA 2074069 A	20-07-1991
			DE 69119408 D	13-06-1996
			DE 69119408 T	05-12-1996
			DK 517704 T	09-09-1996
			EP 0517704 A	16-12-1992
			ES 2088483 T	16-08-1996
			GR 3020302 T	30-09-1996
			US 5364758 A	15-11-1994
US 5538848	A	23-07-1996	AU 695561 B	13-08-1998
			AU 4283696 A	06-06-1996
			CA 2201756 A	23-05-1996
			EP 0792374 A	03-09-1997
			JP 10510982 T	27-10-1998
			WO 9615270 A	23-05-1996
			US 5876930 A	02-03-1999
			US 5723591 A	03-03-1998
EP 0070685	A	26-01-1983	CA 1190838 A	23-07-1985
			JP 1651448 C	30-03-1992
			JP 3017480 B	08-03-1991
			JP 58023795 A	12-02-1983
US 5527898	A	18-06-1996	US 5447839 A	05-09-1995
			US 5182377 A	26-01-1993
			US 5639871 A	17-06-1997
			US 5705627 A	06-01-1995
			AT 138108 T	15-06-1996
			AU 645483 B	20-01-1994
			AU 4401189 A	02-04-1990
			CA 1339262 A	12-08-1997
			DE 68926507 D	20-06-1996
			DE 68926507 T	16-01-1997
			EP 0433396 A	26-06-1991
			JP 2651483 B	10-09-1997
			JP 4500910 T	20-02-1992
			WO 9002821 A	22-03-1990
			US 5283171 A	01-02-1993
WO 9629431	A	26-09-1996	US 5605798 A	25-02-1997
			AU 5365196 A	08-10-1996
			CA 2214359 A	26-09-1996
			CN 1202204 A	16-12-1998
			EP 0815261 A	07-01-1998
EP 0229701	A	22-07-1987	AT 127857 T	15-09-1995
			AU 606043 B	31-01-1991
			AU 6710987 A	16-07-1987
			CA 1279244 A	22-01-1991
			DE 3751513 D	19-10-1995
			DE 3751513 T	28-03-1996
			DK 10787 A	11-07-1987
			ES 2078214 T	16-12-1995
			IE 69565 B	02-10-1996

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

EP 98/06952

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0229701 A		JP 2576980 B	29-01-1997
		JP 62217161 A	24-09-1987
		JP 2574640 B	22-01-1997
		JP 6233700 A	23-08-1994
		US 5386022 A	31-01-1995
		US 5594123 A	14-01-1997
		US 5176995 A	05-01-1993
		US 5008182 A	16-04-1991
EP 0593789 A	27-04-1994	JP 5308999 A	22-11-1993
		WO 9323567 A	25-11-1993
WO 9219743 A	12-11-1992	AU 668355 B	02-05-1996
		AU 2155892 A	21-12-1992
		BG 98200 A	31-01-1995
		BG 101876 A	30-11-1998
		CA 2108466 A	09-11-1992
		CZ 9601210 A	14-08-1996
		CZ 9302377 A	13-04-1994
		EP 0585398 A	09-03-1994
		FI 934937 A	05-01-1994
		HU 69609 A	28-09-1995
		JP 6508026 T	14-09-1994
		NO 934019 A	05-11-1993
		PL 169880 B	30-09-1996
		PL 170151 B	31-10-1996
		PT 100472 A	31-08-1993
		SK 123293 A	08-06-1994
WO 9635437 A	14-11-1996	AT 77895 A	15-06-1999
		CA 2191475 A	14-11-1996
		EP 0769954 A	02-05-1997
		JP 10502943 T	17-03-1998
		NO 970050 A	07-01-1997



# INTERNATIONALES RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP 93/06952

<b>A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 C1201/68		
Nach der internationalen Patentklassifikation (PK) oder nach der nationalen Klassifikation und der PK		
<b>B. RESEARCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoffe, Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole IPK 6 C120		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 91 10675 A (STICHTING RES FONDS PATHOLOGIE) 25. Juli 1991 (1991-07-25)	1-4, 10-12, 14, 16, 17, 19
Y	Seite 4, Zeile 8 - Seite 5, Zeile 17 Seite 8, Zeile 14 - Seite 9, Zeile 16 Seite 12, Zeile 13 - Seite 13, Zeile 7 Seite 14 - Seite 20, Zeile 28 ---	8, 9
Y	US 5 538 848 A (LIVAK KENNETH J ET AL) 23. Juli 1996 (1996-07-23) das ganze Dokument ---	8
Y	EP 0 070 685 A (STANDARD OIL CO) 26. Januar 1983 (1983-01-26) Zusammenfassung: Abbildung 2 ---	9
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<b>Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen</b>		
A. Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist B. älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist C. Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft zu machen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll, oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) D. Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht E. Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
F. Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist G. Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden H. Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist I. Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts
12. Juli 1999		27/07/1999
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL-1280 CH Rijswijk Tel. +31-70 340 2040, Tr. 31 651 local Fax +31-70 340 3014		Bevollmächtigter Beauftragter Reuter, U

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC/EP 98/06952

## C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 527 898 A (BAUER HEIDI M ET AL) 18. Juni 1996 (1996-06-18)  Spalte 8, Zeile 22 - Spalte 9, Zeile 5 Spalte 10, Zeile 26 - Spalte 11, Zeile 30 Spalte 17, Zeile 48 - Spalte 18, Zeile 61; Beispiele 1,3 ---	1,4,6,7, 10-14, 16-19
X	WO 96 29431 A (SEQUENOM INC) 26. September 1996 (1996-09-26) Seite 41, Zeile 15 - Seite 44, Zeile 22; Abbildungen 5.21; Beispiel 5 Seite 15, Zeile 18 - Seite 16, Zeile 4 ---	15
A	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22. Juli 1987 (1987-07-22) Beispiel 2 ---	5
X	CHELLY J ET AL: "Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glia cells." NATURE. (1990 MAR 1) 344 (6261) 64-5. , XP002108801 Abbildung 1 ---	20
X	EP 0 593 789 A (SUMITOMO METAL IND) 27. April 1994 (1994-04-27) Seite 4, Zeile 50 - Seite 6, Zeile 40 ---	20
X	WO 92 19743 A (CHIRON CORP) 12. November 1992 (1992-11-12) Seite 43 Seite 140 ---	22
A	WO 96 35437 A (IMMUNO AG ;EIBL JOHANN (AT); SCHWARZ OTTO (AT); DORNER FRIEDRICH ( ) 14. November 1996 (1996-11-14) Seite 12, Absatz 4 Seite 21, Absatz 2; Beispiel 6 Seite 30, Absatz 2; Tabelle 1.1 Seite 33-34 -----	20,21

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen in der selben Patentfamilie gehören

Publ. Nr. 98/06952

Im Recherchenbericht angegebenes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitgliedern der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9110675 A	25-07-1991	NL 9000134 A	16-08-1991
		AT 137809 T	15-05-1996
		AU 645286 B	13-01-1994
		AU 7071691 A	05-08-1991
		CA 2074069 A	20-07-1991
		DE 69119408 D	13-06-1996
		DE 69119408 T	05-12-1996
		DK 517704 T	09-09-1996
		EP 0517704 A	16-12-1992
		ES 2088483 T	16-08-1996
		GR 3020302 T	30-09-1996
		US 5364758 A	15-11-1994
US 5538848 A	23-07-1996	AU 695561 B	13-08-1998
		AU 4283696 A	06-06-1996
		CA 2201756 A	23-05-1996
		EP 0792374 A	03-09-1997
		JP 10510982 T	27-10-1998
		WO 9615270 A	23-05-1996
		US 5876930 A	02-03-1999
		US 5723591 A	03-03-1998
EP 0070685 A	26-01-1983	CA 1190838 A	23-07-1985
		JP 1651448 C	30-03-1992
		JP 3017480 B	08-03-1991
		JP 58023795 A	12-02-1983
US 5527898 A	18-06-1996	US 5447839 A	05-09-1995
		US 5182377 A	26-01-1993
		US 5639871 A	17-06-1997
		US 5705627 A	06-01-1995
		AT 138108 T	15-06-1996
		AU 645483 B	20-01-1994
		AU 4401189 A	02-04-1990
		CA 1339262 A	12-08-1997
		DE 68926507 D	20-06-1996
		DE 68926507 T	16-01-1997
		EP 0433396 A	26-06-1991
		JP 2651483 B	10-09-1997
		JP 4500910 T	20-02-1992
		WO 9002821 A	22-03-1990
		US 5283171 A	01-02-1993
WO 9629431 A	26-09-1996	US 5605798 A	25-02-1997
		AU 5365196 A	08-10-1996
		CA 2214359 A	26-09-1996
		CN 1202204 A	16-12-1998
		EP 0815261 A	07-01-1998
EP 0229701 A	22-07-1987	AT 127857 T	15-09-1995
		AU 606043 B	31-01-1991
		AU 6710987 A	16-07-1987
		CA 1279244 A	22-01-1991
		DE 3751513 D	19-10-1995
		DE 3751513 T	28-03-1996
		DK 10787 A	11-07-1987
		ES 2078214 T	16-12-1995
		IE 69565 B	02-10-1996

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die in dieser Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06952

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0229701 A		JP 2576980 B	29-01-1997
		JP 62217161 A	24-09-1987
		JP 2574640 B	22-01-1997
		JP 6233700 A	23-08-1994
		US 5386022 A	31-01-1995
		US 5594123 A	14-01-1997
		US 5176995 A	05-01-1993
		US 5008182 A	16-04-1991
EP 0593789 A	27-04-1994	JP 5308999 A	22-11-1993
		WO 9323567 A	25-11-1993
WO 9219743 A	12-11-1992	AU 668355 B	02-05-1996
		AU 2155892 A	21-12-1992
		BG 98200 A	31-01-1995
		BG 101876 A	30-11-1998
		CA 2108466 A	09-11-1992
		CZ 9601210 A	14-08-1996
		CZ 9302377 A	13-04-1994
		EP 0585398 A	09-03-1994
		FI 934937 A	05-01-1994
		HU 69609 A	28-09-1995
		JP 6508026 T	14-09-1994
		NO 934019 A	05-11-1993
		PL 169880 B	30-09-1996
		PL 170151 B	31-10-1996
		PT 100472 A	31-08-1993
		SK 123293 A	08-06-1994
WO 9635437 A	14-11-1996	AT 77895 A	15-06-1999
		CA 2191475 A	14-11-1996
		EP 0769954 A	02-05-1997
		JP 10502943 T	17-03-1998
		NO 970050 A	07-01-1997